

**cDNA-ISOLATION, SEQUENZIERUNG, EXPRESSION UND
PROTEINCHARAKTERISIERUNG
DES FAKTOR XIII DER RATTE**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
vorgelegt von

von
Dorgrit Diepholz-Wilke
aus Sulingen

Marburg/Lahn 1996

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 14.04.1997
angenommen.
Erstgutachter Prof. Dr. Lingelbach
Zweitgutachter Prof. Dr. Müller
Tag der mündlichen Prüfung am 01.08.1997.

1. Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|----|
| 1..... | <u>Einleitung</u> | 4 |
| 1.1..... | Übersicht über die Gerinnungsvorgänge..... | 4 |
| 1.2..... | Besondere Bedeutung des Faktor XIII..... | 7 |
| 1.3..... | Zielsetzung..... | 12 |
| 2..... | <u>Material und Methoden</u> | 13 |
| 2.1.1... | Material..... | 13 |
| 2.1.2... | Organismen und Vektoren..... | 13 |
| 2.1.3... | Chemikalien..... | 14 |
| 2.2..... | Methoden..... | 16 |
| 2.2.1... | cDNA-Bankscreening | 16 |
| 2.2.1.1... | Puffer..... | 16 |
| 2.2.1.2... | Markieren der cDNA-Fragmente..... | 18 |
| 2.2.1.3... | Markierungen von Oligonukleotiden..... | 18 |
| 2.2.1.4... | Reinigung von markierten DNA Fragmenten..... | 19 |
| 2.2.1.5... | Reinigung der markierten Oligonukleotide mit Chroma-Spin- Säulen..... | 19 |
| 2.2.1.6... | Plattieren der cDNA-Bank..... | 20 |
| 2.2.1.7... | Hybridisierung..... | 21 |
| 2.2.1.8... | Vereinzelung positiver Klone aus dem cDNA-Bankscreening..... | 21 |
| 2.2.1.9... | Phagen-Hybridisierungstest..... | 21 |
| 2.2.2... | Klonierung..... | 22 |
| 2.2.2.1... | Medien und Puffer..... | 22 |
| 2.2.2.2... | Bakterienkultur..... | 23 |
| 2.2.2.3... | Isolierung der Phagen-DNA..... | 23 |
| 2.2.2.4... | Herstellung von Insert und Vektor..... | 24 |
| 2.2.2.5... | Ligation..... | 25 |
| 2.2.2.6... | Plasmidpräparation..... | 25 |
| 2.2.3... | Sequenzierung..... | 26 |
| 2.2.4... | Hefeexpression..... | 27 |
| 2.2.4.1... | Hefekultur und Fermentation..... | 27 |
| 2.2.4.2... | Transformation in Hefe..... | 28 |
| 2.2.4.3... | Klonscreening..... | 29 |
| 2.2.5... | Proteinreinigung von rekombinantem Ratten FXIII aus Saccharomyces cerevisiae Cl3Abys8..... | 22 |

| | |
|--|---------|
| 2.2.5.1·SDS Elektrophorese und Western Blot | 31 |
| 2.2.5.2·Nativ Elektrophorese..... | 32 |
| 2.2.5.3·Isoelektrische Fokussierung..... | 33 |
| 2.2.5.4·Aktivitätstest..... | 34 |
| 2.2.5.5·Proteinbestimmungen..... | 34 |
| 2.2.5.6·Fremdproteinbestimmung durch ELISA..... | 35 |
| 2.2.5.7·Molekulargewichtsbestimmung durch HPLC..... | 36 |
| 3. <u>Ergebnisse</u> | 37 |
| 3.1.....cDNA-Bankscreening, Klonierung und Sequenzierung..... | 37 |
| 3.1.1...cDNA-Bankscreening..... | 37 |
| 3.1.2...Klonierung..... | 42 |
| 3.1.3...Sequenzierung..... | 44 |
| 3.2.....Hefeexpression..... | 52 |
| 3.2.1...Klonierung in die Expressionsplasmide..... | 52 |
| 3.2.1.1.Klonierung in pEMBLyex4..... | 55 |
| 3.2.1.2.Klonierung in pMB354 | 60 |
| 3.2.2...Analyse der Produktionsleistung der gefundenen Klone..... | 63 |
| 3.3.....Proteinreinigung und -charakterisierung..... | 65 |
| 3.3.1...Proteinreinigung..... | 65 |
| 3.3.2...Proteincharakterisierung..... | 75 |
| 3.3.2.1.SDS-Gelelektrophorese und Westernblot..... | 75 |
| 3.3.2.2.Nativ-Gelelektrophorese..... | 77 |
| 3.3.2.3.Isoelektrische Fokussierung und Westernblot..... | 79 |
| 3.3.2.4.Spezifische Aktivität und Aktivierungsgeschwindigkeit..... | 81 |
| 3.3.2.5.Fremdproteinbestimmung..... | 82 |
| 3.3.2.6.Bestimmung der nativen Molekulargröße..... | 83 |
| 4. <u>Diskussion</u> | 85 |
| 5. <u>Zusammenfassung</u> | 95 |
| 6. <u>Literaturverzeichnis</u> | 97 |
| 7. <u>Danksagung, Lebenslauf und ehrenwörtliche Erklärung</u> | 108 |

Abkürzungen:

| | |
|-----------|--|
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BCIP | Brom-Chlor-Indol-Phosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovine serum albumin |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| HIC | hydrophobe Interaktionschromatographie |
| kb | Kilobasen |
| NBT | Nitrobluetetrazolium |
| NC | Nitrocellulose |
| NET | Natrium-EDTA-Tris-Puffer |
| PBS | phosphat bufferd saline |
| PEG | Polyethylenglycol |
| pfU | plaque forming Unit=Plaque bildende Einheit |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| RFXIII | rekombinanter Faktor XIII -a Untereinheit- aus der Ratte |
| rhu-FXIII | rekombinant humaner Faktor XIII -a Untereinheit |
| rpm | rounds per minute= Umdrehungen pro Minute |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SSC | Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer |
| SSPE | Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA-Puffer |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |

1 Einleitung

1.1 Übersicht über die Gerinnungsvorgänge

Die Hämostase nach einer Gewebstraumatisierung gliedert sich in zwei Phasen: 1. Die zelluläre Blutstillung mit der reflektorischen Gefäßengstellung und 2. die plasmatische Blutgerinnung. Daran schließt sich die Wundheilung an. Im folgenden soll nur auf die plasmatische Blutgerinnung eingegangen werden.

An der plasmatischen Blutgerinnung sind dreizehn Gerinnungsfaktoren, zwei Phospholipoproteine, Thrombocytenfaktor 3 und Thrombokinase, sowie Kalzium und sechs Inhibitoren beteiligt. Die Gerinnungsfaktoren I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII und Präkallikrein liegen inaktiv vor und müssen erst proteolytisch aktiviert werden. Als Co-Faktoren fungieren hochmolekulares Kininogen, die Gerinnungsfaktoren V und VIII, sowie Thrombomodulin und Protein S. Faktor I (Fibrinogen) fungiert als Substrat, hat aber bei Faktor XIII auch die Rolle eines Co-Faktors, da seine Anwesenheit den Ca^{2+} -Bedarf bei der Aktivierung von Faktor XIII herabsetzt (Hornyak und Shafer, 1992).

Die Reaktionen vollziehen sich nicht in Lösung, sondern an Oberflächen, wobei während der Kontaktphase geschädigtes Gefäßendothel und die damit freiwerdenden Phospholipide als Auslöser dienen. Die einzelnen Reaktionsschritte folgen in Form einer Kaskade aufeinander, indem sie sich gegenseitig verstärken. Die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X und Protein C und S werden unter Vitamin K Einfluß gebildet. Sie besitzen γ -Carboxyglutaminsäurereste, mit denen sie sich über Kalzium an Phospholipide binden können.

Gerinnungsprozesse können über zwei getrennt Systeme ausgelöst werden: Zum einen über das endogene (intrinsische) System, an dem nur Gerinnungsfaktoren beteiligt sind, die im Blut zirkulieren, zum anderen über das exogene (extrinsische) System, bei dem die aus verschiedenen Zellen stammende Thrombokinase eine Rolle spielt. Beide Wege besitzen eine gemeinsame Endstrecke, die ab Faktor X zu einem stabilen Gerinnsel führt.

Die Stimulierung des endogenen Systems erfolgt über die Aktivierung von Faktor XII an Oberflächenstrukturen, wie beispielsweise Basalmembranen, Kollagen, Lipopolysacchariden, aktivierten Thrombozyten und Antigen-Antikörperkomplexen. Faktor XII modifiziert anschließend Präkallikrein zu Kallikrein, das seinerseits reziprok Faktor XII zu Faktor XIIa umwandelt. Hochmolekulares Kininogen bindet Faktor XI an die verletzte Oberfläche, der durch XIIa in XIa umgeformt wird. Faktor XIa aktiviert in Gegenwart von Kalzium und Phospholipiden Faktor IX zu Faktor IXa. Anschließend bindet der Thrombocytenfaktor 3 über Kalzium die Faktoren IXa und X, wobei gleichzeitig Faktor X in seine aktive Form (Xa) überführt wird. Durch aktivierten Faktor VIII wird diese Reaktion beschleunigt.

Durch freigesetzte Thrombokinasen oder stimulierte Monocyten wird im exogenen System der Gerinnungsvorgang ausgelöst. Thrombokinasen bindet über Kalzium die Faktoren VII und X, wobei Faktor X in seine aktive Form überführt wird. Faktor VII wird seinerseits durch Faktor Xa aktiviert. Allerdings ist Faktor VII auch durch die Faktoren XIIa, IXa oder Thrombin aktivierbar.

Der weitere Verlauf der Gerinnungskaskade ist für beide Systeme gleich.

Jetzt entsteht aus Thrombozytenfaktor 3 oder Gewebethrombokinasen zusammen mit den Faktoren Xa und Va der Prothrombin-aktivierende Enzymkomplex Prothrombinase. Prothrombin wird einerseits durch den Phospholipidanteil des Komplexes, andererseits durch Faktor V an den Komplex gebunden.

Thrombin spaltet von der A α - bzw. B β -Kette des Fibrinogens die Fibrinpeptide A und B ab. Die Fibrinmonomere polymerisieren zunächst locker zu Fibrin, das durch den Faktor XIII quervernetzt und stabilisiert wird. Es entstehen durch die Wirkung dieser Transglutaminase ϵ (γ -glutaminyll-lysyl-Brücken zwischen α - bzw. γ -ketten des Fibrins (α -Polymere, γ -Dimere).

Nach abgelaufener Gerinnung retrahiert sich das Gerinnsel in Gegenwart von Thrombocyten oder kann sich in Gegenwart von Plasmin wieder auflösen.

Zu den Gerinnungsfaktoren im einzelnen siehe Tabelle 1:

Tabelle 1: Übersicht über die Gerinnungsfaktoren

(nach: W. Forth et al., 1987, verändert)

| Faktor | Synonyma(a) | relative Molekülmasse ($\times 10^3$) | Halbwertszeit in h | Biochemische Bedeutung |
|--------|-------------|---|--------------------|--|
| F I | Fibrinogen | ~340 | 96-112 | Inaktive Vorstufe des Fibrins |
| F II | Prothrombin | ~72.5 | 50-70 | Inaktive Vorstufe des Thrombins, das über die proteolytische inaktive Zwischenstufe Prothrombin ($MM \sim 52 \times 10^3$) gebildet wird |
| | Thrombin | ~37 | | Proteolytisches Enzym, das aus Fibrinogen Fibrin bildet |

Fortsetzung Tabelle 1: Übersicht über die Gerinnungsfaktoren

| Faktor | Synonyma(a) | relative Molekülmasse ($\times 10^3$) | Halbwertszeit in h | Biochemische Bedeutung |
|--------|--------------------------|---|--------------------|--|
| FIII | Gewebs-thrombo-kinase | ~53 | | Gewebe-Protein; Bildung des Gewebeprothrombinaktivators im exogenen Gerinnungssystem. Dabei handelt es sich um proteolytisches aktives Phospholipoprotein (MM ~167x10 ⁶) |
| FIV | Ca ²⁺ -Ionen | 0,04 | | Enzymaktivatoren an verschiedenen Stellen in der plasmatischen Gerinnung |
| FV | Proaccelerin | ~350 | ~35 | Bestandteil des Komplexes, in dem die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin vor sich geht. Wird durch Thrombin inaktiviert |
| FVII | Proconver-tin | 50 | 3-6 | Der aktive FVII aktiviert zusammen mit FIII und Ca ²⁺ -Ionen im exogenen Gerinnungssystem den FX. FVII wird durch Kallikrein inaktiviert, was durch Vermittlung von FXIIa erfolgt. |
| FVIII | antihämo-philes Globulin | 250-12000 | 8-16 | An der Bildung des Plasmaprothrombinkomplexes im endogenen Gerinnungssystem beteiligt. |
| FIX | antihämo-philer Faktor B | ~57 | 20-30 | Die inaktive Vorstufe von FIX wird durch FXI aktiviert. An der Bildung des Plasmin-Prothrombin-Aktivators im endogenen Gerinnungssystem beteiligt. |
| FX | Stuart-Prower-Faktor | 59 | 40-60 | Dient der Bildung des aktiven Gewebs- und Plasma-Prothrombinaktivators, d.h. auf der Endstrecke des exogenen und endogenen Gerinnungssystems zur Aktivierung der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin. |

Fortsetzung Tabelle 1: Übersicht über die Gerinnungsfaktoren

| Faktor | Synonyma(a) | relative Molekülmasse ($\times 10^3$) | Halbwertszeit in h | Biochemische Bedeutung |
|--------|--|---|--------------------|--|
| FXI | Plasma-Thromboplastin-Antecedent | 160 | 48-60 | An der Bildung des Plasma-Prothrombinaktivators beteiligt; hat esteratische Aktivität |
| FXII | Hagemann-Faktor | 76 | 48-72 | Die aktivierte Form des FXII hat eine Auslöserfunktion im endogenen Gerinnungssystem bei der Bildung des Plasma-Prothrombinaktivators; außerdem ist der FXII das Schaltsystem bei der Vernetzung der Aktivierungen des Kinin-Systems und des Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems |
| FXIII | Fibrinstabilisierender Faktor, Fibrinolyse | 320 | 96-144 | Quervernetzung und Stabilisierung der Fibrinmonomere, Bindung von α_2 Plasmin-Inhibitor an das Gerinnsel |

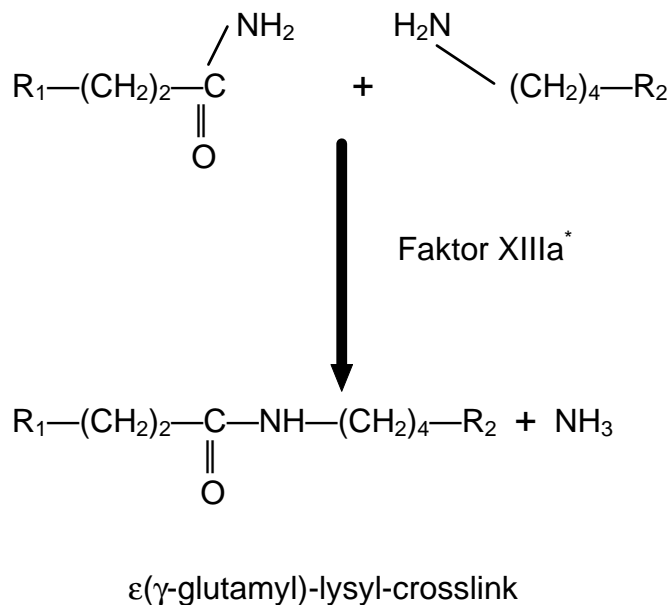
(In der Spalte der relativen Molekülmasse und der Halbwertszeit sind jeweils größter und kleinster Wert aus der Literatur angegeben.)

1.2 Besondere Bedeutung des Faktor XIII

Der fibrinstabilisierende Faktor wurde von Laki und Lorand 1948 erstmals beschrieben. Als letztes Zymogen in der Blutgerinnungskaskade hat er physiologisch die Aufgabe, Fibrin γ - γ Ketten verschiedener Fibrinmoleküle untereinander zu vernetzen und so die typischen Fibrin- γ -Ketten-Dimere zu bilden, sowie α - und γ -Ketten kovalent zu stabilisieren (Chen und Doolittle, 1971) und dadurch das entstandene Gerinnsel mechanisch zu festigen. Weiterhin bindet FXIII α_2 -Plasmin-Inhibitor an das Gerinnsel und verhindert damit den Abbau des Thrombus durch Plasmin (Tamaki und Aoki, 1982). Durch seine ausgesprochen hohe Affinität zu den α - und β -Ketten der D-Domänen von Fibrinogen ist FXIII immer mit Fibrinogen assoziiert, wenn er im Blut zirkuliert. (Hornayk und Shafer, 1992) Während FXIII eine ganze Reihe von Substraten umsetzen kann (vgl. Tabelle 2), laufen die Vernetzung der Fibrinketten sowie das Koppeln α_2 -

Plasmin-Inhibitor an den Thrombus wesentlich schneller ab, als die Reaktion mit anderen Substraten (Hornayk und Shafer, 1992). Aus dieser Beobachtung kann man schließen, daß die physiologischen Substrate für FXIII Fibrin und α_2 -Plasmin-Inhibitor sind. FXIII kommt im Plasma, in Makrophagen, Thrombocyten und in der Plazenta vor.

Abb.1: Ausbildung des $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{-lysyl-crosslinks}$ durch Faktor XIII. R_1 bezeichnet den Acylgruppendonator, R_2 den Acylgruppenakzeptor.



Faktor XIII (FXIII) gehört in die Gruppe der Transglutaminasen. Diese Enzyme katalysieren einen Ca^{2+} -abhängigen Acylgruppentransfer (siehe Abb. 1). Acylgruppendonator ist dabei ein peptidgebundenes Glutamin. Acylgruppenakzeptor ist die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes oder eine primäre Aminogruppe eines natürlich vorkommenden Polyamins wie Putrescin oder Spermidin. In den meisten Fällen ist das Ergebnis dieser Reaktion ein γ -glutamyl ϵ -lysyl-crosslink innerhalb oder zwischen Polypeptidketten. Die Verknüpfung verläuft über mehrere Schritte, wobei zuerst ein Cystein des aktiven Zentrums der Transglutaminase mit der γ -carboxamid-Gruppe eines Glutaminrestes reagiert und sich so der Acyl-Enzym-Übergangskomplex bildet. Bei diesem ersten Schritt wird dann Ammoniak frei. Im zweiten Schritt reagiert der Komplex mit einem primären Amin und bildet dabei die Isopeptidbindung aus, gleichzeitig wird das reaktivierte Enzym freigesetzt. Ihre Energie bezieht die Reaktion aus dem Freisetzen von Ammoniak und dessen Protonierung. Als Substrate kommen eine ganze Reihe von Proteinen in Frage, jedoch variiert die Substratspezifität unter den verschiedenen Transglutaminasen. Die Reaktion ist irreversibel, da erst nach dem proteolytischen Abbau der vernetzten Proteine die γ -glutamyl- ϵ -lysyl-crosslinks gespalten werden können. (Aeschilmann

und Paulsson, 1994). Die nach dem Abbau resultierende Dipeptid-Verbindung wird dann von dem Enzym γ -glutamylamin-Cyclotransferase gespalten (Fink et al., 1980).

Transglutaminasen sind eine weit verbreitete Enzymfamilie in Wirbeltieren und treten auch in Wirbellosen und Pflanzen auf. Sie sind evolutionär stark konserviert, was für eine große Rolle dieser Enzyme spricht. In Wirbeltieren unterscheidet man eine ganze Reihe von Transglutaminasen: Im Plasma tritt FXIII (Fibrin stabilisierender Faktor, Fibrinolygase) auf, in Leber, Erythrocyten und Endothel gibt es die Gewebe-Transglutaminase (Tg_e) oder Transglutaminase Typ II. In den Keratinocyten findet sich eine weitere Transglutaminase (Tg_k), die auch Transglutaminase Typ I genannt wird. In Kallusgewebe, Haarfollikeln und in der Epidermis gibt es die epidermale Transglutaminase (Tg_e), die auch Transglutaminase Typ III genannt wird. Auch in der Prostata findet sich eine spezielle Transglutaminase (Tg_p), und in den Erythrocyten gibt es ein Membranstrukturprotein, Erythrocyten-Membranprotein Bande 4.2, das zu den Transglutaminasen zählt, obwohl es seine katalytischen Eigenschaften verloren hat.

Bei Wirbellosen wurden bisher zwei Transglutaminasen näher beschrieben: Zum einen die *Limulus*-Haemocyten-Transglutaminase (Tg_h) (Tokunaga, Yamada et al 1993; Tokunaga, Muta et al 1993) und zum anderen das Grashüpferprotein Annulin (Singer et al 1992). Möglicherweise fungieren diese Proteine als FXIII-Analoga.

Biochemisch gesehen ist FXIII ein Tetramer, das sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt und eine Konfiguration a_2b_2 aufweist. Katalytisch aktiv ist FXIII nur in der a_2 -Form, die intrazellulär angetroffen wird, während das Tetramer nur im Plasma zu finden ist. Die a-Untereinheit besteht aus 731 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 82.99 kD (Grundmann et al., 1986). Die b-Untereinheit besteht aus 641 Aminosäureresten, welche in 10 sich wiederholenden Domänen angeordnet sind, die auch GP-1 Domänen, consensus repeats oder sushi-Domänen genannt werden. Sie hat ein apparentes Molekulargewicht von 76.5 kD (Ichinose et al., 1986). Im Plasma wird die a_2b_2 -Form durch Thrombin aktiviert. Während der Aktivierung spaltet Thrombin ein etwa 4 kD schweres Aktivierungspeptid (Lukacova et al., 1991) von der a_2 -Untereinheit bei Arg₃₇-Gly₃₈ ab. Durch den Einfluß von Ca^{2+} in einer Konzentration von 1.5 mM und Fibrinogen (0.1 mM) dissoziiert die b_2 -Untereinheit ab. Die Aktivierung kann auch ohne Thrombin in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (0.1 M) erfolgen (Lorand et al., 1981). Thrombin spaltet FXIII auch an einer zweiten Stelle, nämlich in der Position Lys₅₁₃-Ser oder Arg₅₁₅-Ser (Takahashi, et al., 1986, McDonagh, 1991). Aus dieser Proteolyse resultieren zwei Peptide, eines mit dem aktiven Zentrum und einem relativen Molekulargewicht von 56kDa und ein kleineres Peptid von 24kDa. Diese proteolytische Spaltung vollzieht sich unter physiologischen Bedingungen weitaus langsamer als die Aktivierung (Bishop et al 1990). Über

die enzymatische Aktivität des 56kDa-Fragmentes gibt es widersprüchliche Aussagen (Takahashi, et al. 1986, Hettasch und Greenberg, 1994, Yee et al 1994, Lai et al 1994).

Tabelle 2: Substrate für das Cross-linking von FXIII

| Acylgruppendonor | Acylgruppenakzeptor | Referenz |
|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Fibrin, Vinculin | Fibrin/Fibrinogen | Hada et al., 1986, Mary et al., 1987 |
| Fibrin | α_2 -Plasmininhibitor | Tamaki& Aoki, 1981 |
| Fibrin | Fibronektin | Hada et al., 1986 |
| Fibrin | von Willebrand Faktor | Hada et al., 1986 |
| Faktor V, Fibrin | Aktin | |
| Fibronektin, v. Willebrand Faktor | Kollagen | Barry& Mosher, 1989 |
| Aktin, Fibronektin | Myosin | J. McDonagh, 1991 |
| Thrombospondin | Thrombospondin | J. McDonagh, 1991 |
| Gelsolin, Fibrin | Gelsolin | J. McDonagh, 1991 |

Trotz der deutlichen Gewebsspezifität ist es wahrscheinlich, daß alle FXIII -Formen Produkte eines einzigen Gens sind, da sich die extrazellulären und intrazellulären enzymatisch aktiven Proteine nicht unterscheiden. Die katalytische a-Untereinheit liegt auf dem Chromosom 6 bei p 24-25 und ist mit dem MHC Locus verbunden (Board et al 1988, Olaisen et al., 1985, Board et al., 1984). Das Gen für die a-Untereinheit ist über 160 kb lang und besteht aus 15 Exons, die durch 14 Introns unterbrochen werden. Sowohl die Region, die für das Aktivierungspeptid codiert, als auch die Nukleotidsequenzen, die für aktives Zentrum, Ca^{2+} -Bindungsstellen, für die Thrombinspaltung und für die Inaktivierung codieren, liegen auf unterschiedlichen Exons (Ichinose und Davie, 1988). Die b-Untereinheit liegt auf dem Chromosom 1 bei q 32 (Webb et al., 1989). Das Gen ist 28 kb lang und besteht aus 12 Exons, die von 11 Introns unterbrochen werden (Bottenus et al., 1990).

Angeborener FXIII-Mangel ist eine seltene, autosomale rezessive Erbkrankheit, die in den meisten Fällen das Chromosom 6 betrifft und daher auf einem Ausfall der a-Untereinheit beruht. Nur sehr wenige Fälle sind bekannt, in denen das Chromosom 1 betroffen ist, das für die b-Untereinheit des FXIII codiert. Patienten mit angeborenem FXIII-Mangel leiden unter einer

lebenslangen Blutungs-und habitueller Abortneigung sowie einer verzögerten Wundheilung (Rodeghiero et al., 1987, Egbring et al 1988, Board et al 1992, Kamura et al 1992).

1.3 Zielsetzung:

Die vorliegende Arbeit stand im Zusammenhang mit einem Projekt der Behringwerke, das die Rolle von FXIII in der Wundheilung untersuchen sollte. Da die Funktion von FXIII in der Blutgerinnung lange bekannt ist und FXIII zu den bestuntersuchten Transglutaminasen überhaupt gehört, war es eine reizvolle Aufgabe, an einem Projekt beteiligt zu sein, das die Beteiligung von FXIII in der Wundheilung bearbeiten sollte.

Für dieses Projekt wurde ein Tiermodell benötigt, das es ermöglicht, im homologen System Wundheilungsexperimente durchzuführen, da sich alle bisherigen Ergebnisse zur Wundheilung auf Versuche mit humanem FXIII an unterschiedlichen Tierspezies beziehen. In diesem Rahmen war das Ziel der Arbeit, FXIII aus der Ratte für tierexperimentelle Studien bereitzustellen, um mit monoklonalen Antikörpern den FXIII-Spiegel im Versuchstier abzusenken. An den so künstlich depletierten Tieren würden in einem Schnittwundenmodell Wundheilungsexperimente gut durchzuführen sein, wenn gleichzeitig als Therapeutikum der autologe Gerinnungsfaktor bereitstünde. Bei dem heterologen Protein ergibt sich die Schwierigkeit einer Immunantwort auf das Medikament, was eine längere Therapiedauer oder aber eine höhere Dosierung erheblich erschwert.

Die Arbeit gliedert sich in einen molekularbiologischen und einen proteinchemischen Teil. Im Rahmen der molekularbiologischen Experimente wurde die RFXIII-cDNA aus einer cDNA-Bank isoliert, sequenziert und in mehrere Expressionsvektoren kloniert. Der proteinchemische Teil der Arbeit umfaßt die Reinigung des RFXIII aus Hefelysat und die Charakterisierung des Proteins.

Folgende Fragen waren vor dem geschilderten Hintergrund von besonderem Interesse:

1. Wie ähnlich sind sich rhu-FXIII und RFXIII aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung, und welche Unterschiede lassen sich anhand der Basensequenz erwarten?
2. Gibt es funktionelle Unterschiede (Aktivität, Aktivierungsgeschwindigkeit) zwischen den beiden Proteinen und lassen sich die für rhu-FXIII etablierten Testmethoden (insbesondere der Aktivitätstest) auf RFXIII übertragen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Für die Molekularbiologie

Autoradiographiekassetten mit Verstärkerfolie: DuPont „Quanta fast detail“

Chroma Spin Säulen, Clontech, Palo Alto, USA, Vertrieb: Renner, Dannstadt

cDNA-Bank: Ratten Makrophagen cDNA Bank, in λ gt 10 Stratagene, San Diego , USA

Gene clean kit, Bio 100, Vista, USA, Vertrieb: Dianova, Hamburg

Nitrozellulose Filter: 0.45 μ m, BA 85, Schleicher und Schüll, Dassel

Qiagen λ Präparation kit, Qiagen, Chatsworth, USA, Vertrieb: Qiagen, Hilden

Qiagen Plasmid Präparation kit

Röntgenfilme: KodakXAR-5

Sequenase kit, USB, Cleveland, USA

Chemikalien:

Agarose, Sigma

Ampicillin, Sigma

EDTA, Roth Karlsruhe

Ethidiumbromid, Roth

Ficoll

Heringssperma DNA

Histidin

Leucin

Maltose

PVP40

Tetracyclin

TRIS, Merck, Darmstadt

Restriktionsendonukleasen:

Boehringer Mannheim, Mannheim

Merck, Darmstadt

Stratagene, La Jolla, USA

Marker: 1kb ladder, GIBCO BRL, USA

Radioisotope: Desoxyadenosin-5'- α -³²P-Triphosphat (3000 Ci/mM)

Desoxycytosin-5'- α -³²P-Triphosphat

Desoxyadenosin-5'- α -³⁵S-Thiophosphat (1500-1000 Ci/mM)

Die Radioisotope wurden von Amersham Buchler, Braunschweig oder NEN/Du Pont, Bad Homburg bezogen.

2.1.2 Für die Proteinreinigung

Chromatographiematerial:

DEAE-EMD Fractogel, Merck

Phenylsepharose HP, Pharmacia, Uppsala, Schweden

Cellufine GC 700, Amicon

Proteinnachweis über BCA Methode, Pierce, BA oud-Beijerland, Holland

Aktivitätstest: Berichromassay, Behringwerke, Marburg

Chemikalien:

BSA, Sigma

PEG

Proteinfärbung für Blots: Auro dye forte, Janssen, Olen, Belgien

NBT, BCIP, Sigma

Marker: prestained Markermix „high“, GIBCO BRL, USA

Hefeprotein ELISA: Anti FXIII Mock 01 POD Konjugat CH.: 2470;1mg/mL;Behringwerke

FXIII Mock 01 Standard 4µg/mL Behringwerke

Für Hefeprotein ELISA:

Mikrotiterplatten CH.: 900729 beschichtet mit Anti FXIII Mock 01, Immunisierung 11544, Op.900206, 10µg/Well, Behringwerke

Alle anderen Chemikalien wurden -soweit nicht anders angegeben- in p.A.-Qualität verwendet und von den Firmen Merck, Roth, Karlsruhe und Sigma bezogen.

2.2 Geräte:

Szintillationszähler, Beckmann, Dreieich-Buchsschlag

Zentrifugen:

Beckmann, Sorvall; Kontron, Eching

Suprafuge 22, Labofuge, Minifuge GL, Biofuge, Heraeus Christ, Osterode 5415C, Eppendorf, Hamburg

Rotoren:

SS34, GS3, HS4 Kontron, JA 14, JA 20, HB4, Beckmann

Spektralfotometer Uvikon 820, Kontron

Für die HPLC:

HPLC Pumpe, Merck Hitachi L600,

UV Detektor, 280 nm, LDC 1203,

HPLC Trennsäule TSK G300SWXL, Supleco, 300mm x 7.5 mm, Bad Homburg

Recorder, PM 8252A, Philips, Kassel

Filtereinheit Typ GV, Millipore, Eschborn

Autoinjektor zur Probenaufgabe, Waters WISP 710A, Waters, Königstein

2.4 Organismen und Vektoren:

Organismen:

Saccharomyces cerevisiae CL3 ABYS86: *ura2-3 leu2 his pra1 prb1 prc1 cps1* (Prof. Dieter Wolf, Universität Stuttgart)

E.coli RR1: K12 RR1 Δ M15: *leu pro thi strA hsd r⁻ m⁻ lacZ Δ M15 F⁻ lac I^Q Z Δ M15 pro⁺* (Dr. Seemann, Behringwerke, ref: Rütther, 1982)

E.coli Xl₁ blue: *recA⁻ recA1 lac⁻ endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 [F⁻proAB lac I^Q lacZ Δ M15 Tn10]* (Stratagene, San Diego, ref.:Sambrook et al., 1989)

E.coli C600 HFL: *F⁻ thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 hflA150 [Chr::Tn10]*, (Promega)

Vektoren:

Phagen: λ gt 10: *IsrII1^o b527 srlI3^o imm 434 (srl 434⁺) srlI4^o srlI5^o* (Stratagene, San Diego , USA, ref: Sambrook et al., 1989)

Plasmide: p130FXIII (Grundmann, Behringwerke)

Bluescript pKS⁻ (Stratagene, San Diego)

pEMBLyex4 (Oppen, Behringwerke, ref.:Cesarini und Murray, 1987)

pMB 354 (Bröcker, Behringwerke)

2.2 Methoden

2.2.1 cDNA-Bankscreening

2.2.1.1 Puffer:

SM Puffer (Suspensionsmedium)

0.1M NaCl

0.008M $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

0.05M Tris

0.01% Gelatine

auf pH 7.5 mit HCl einstellen

Top-Agar:

LB-Medium

0.7% Agarose

0.2% Maltose

Denaturierungslösung:

1.5M NaCl/0.5M NaOH

Neutralisierungslösung:

1.5M NaCl/0.5M Tris/HCl, pH 8.0

Waschlösung I:

3x SSC+ 0.1% SDS

Vorhybridisierungslösung:

6x NET-Puffer

10x Denhardts Solution

0.1% SDS

50µg/mL denaturierte Heringssperma DNA

Hybridisierungslösung:

6x NET-Puffer

10x Denhardts Solution

0.1% SDS

0.09µCi/mL

Denhardts Solution 50x:

1%Ficoll

1%PVP 40

1%BSA

Waschlösung II:

6x SSC

0.5% Na-Pyrophosphat.

NET-Puffer 20x:

3M NaCl

0.3M Tris

0.02M EDTA

auf pH 8.3 mit HCl einstellen.

SSC-Puffer 20x:

3M NaCl

0.3M Na-Citrat

auf pH 7.0 mit HCl einstellen.

SSPE-Puffer 20x:

3.6M NaCl

0.2M NaH₂PO₄

0.02M EDTA

auf pH 7.4 einstellen mit NaOH

TE-Puffer:

0.01M Tris

0.001M EDTA

auf pH 8.0 einstellen mit HCl

2.2.1.2 Markieren der cDNA-Fragmente:

cDNA Fragmente wurden mit dem Multiprime labeling Kit von Amersham markiert. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

25ng DNA wurden mit H₂O so verdünnt, daß die Reaktion in einem Gesamtvolumen von 50µL durchgeführt werden konnte. Nachdem sie 3min bei 95° C denaturiert worden war, wurde sie anschließend im Eisbad 3min abgekühlt. Die abgekühlte DNA wurde mit Puffer und mit Primer (Mischung aus „random“ Primern) versetzt und mit dem Klenow Fragment der DNA Polymerase I die Reaktion gestartet. Der Reaktionsansatz wurde für 3-5h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Arbeitsablauf ist in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

| | |
|--------------------------|------|
| DNA (25 ng) | 1µL |
| H ₂ O | 27µL |
| -----3min, 95 °C----- | |
| -----3min Eis----- | |
| Puffer | 10µL |
| Primer | 5µL |
| dCTP* [P ³²] | 5µL |
| Enzym | 2µL |
| 3-5h Raumtemperatur | |

Die markierten Fragmente wurden zur weiteren Reinigung direkt auf Nick Translationssäulen aufgetragen (s.u.2.2.1.5)

2.2.1.3 Markierungen von Oligonukleotiden:

(siehe Sambrook, et al., 1989)

Zur Markierung von Oligonukleotiden wurde nach einer Methode nach Sambrook et al., 1989 verfahren. Das zu markierende Oligonukleotid wurde im äquimolaren Verhältnis mit radioaktiv markiertem ATP* [P³²] versetzt. Da das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes 50µL betragen sollte, wurden 5µL eines kommerziellen 10-fach Puffers (Boehringer, Mannheim) zu Oligonukleotid und ATP gegeben, mit H₂O wurde auf die erforderlichen 50µL aufgefüllt. Mit dem Enzym Polynukleotidkinase wurde die Reaktion gestartet. Die Reaktion fand 30min bei 37° C im Wasserbad statt. Zur Übersicht siehe folgendes Pipettierschema:

10µL ATP* [P³²] (= 37 pmol)

2µL Oligo (= 37 pmol)

5µL PNK Puffer

2µL Enzym (Polynukleotidkinase, 8 U)

31µL H₂O

30min 37°C

Die Reaktion wurde mit 1/10 des Ansatzvolumens an 0.5M EDTA, pH 8.0 gestopt.

Die markierten Oligonukleotide wurden zur weiteren Reinigung auf Chroma-Spin-Säulen aufgetragen (s.u. 2.2.1.6).

2.2.1.4 Reinigung von markierten DNA Fragmenten:

Die markierten DNA Fragmente wurden auf Nick-Translationssäulen von Pharmacia aufgetragen. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Säulen enthielten Sephadex G-50® als Chromatographiematerial und hatten die Dimensionen von 0.9x2.0 cm. Da diese Säulen für die Reinigung von radioaktiv markierten Fragmenten von mehr als 30 bp Länge konzipiert waren, mußte für die Reinigung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden auf andere Säulen zurückgegriffen werden (s.u.).

Zunächst wurden die Nick-Translationssäulen mit 4mL TE-Puffer equilibriert. Dann wurde die Probe auf die Säule aufgetragen, deren Volumen 100µL nicht überschreiten durfte. Die Säule wurde mit 400µL TE gewaschen und mit abermals 400µL desselben Puffers eluiert. Anschließend konnte die markierte Probe im Szintillationszähler gemessen werden: Dazu wurde 1µL der zu messenden Probe auf Filterpapier (Millipore, HAWP, 0.45µm) aufgetropft und 8mL Szintillationsflüssigkeit dazugegeben. Dann konnte die Probe gemessen werden.

2.2.1.5 Reinigung der markierten Oligonukleotide mit Chroma-Spin-Säulen:

Das Reinigungsschema für die radioaktiv markierten Oligonukleotide folgt dem Protokoll des Herstellers (CLONTECH Laboratories).

Die Säule wurde mehrfach gekippt, um das Säulenmaterial im Säulenpuffer zu resuspendieren.

Anschließend wurde zuerst die obere Säulenkappe, dann die untere entfernt und die Säule auf Reaktionsgefäßen trocken laufen gelassen.

Der Puffer wurde dekantiert und die Säule 3min bei 2000rpm zentrifugiert (Minifuge GL, Heraeus Christ).

Nachdem der abzentrifugierte Puffer dekantiert war, wurde die Säule erneut zentrifugiert und in ein steriles Reaktionsgefäß gestellt. Die Probe wurde in die Mitte auf das Gelbett pipettiert und die Säule 5min bei 2000rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Säule vom Reaktionsgefäß entfernt und die darin befindliche Probe aufgehoben. Die Säule wurde verworfen.

und die gereinigte Probe konnte in der Hybridisierung eingesetzt werden, nachdem die Effektivität der Markierung im Szintillationszähler gemessen worden war, wie unter 2.2.1.4 beschrieben.

2.2.1.6 Plattieren der cDNA-Bank

Kultivierung der Wirtsbakterien für das Anzüchten einer Phagen-cDNA-Bank:

E.coli C600 HFL wuchs über Nacht in LB Medium (Kulturvolumen 50mL), wurde abzentrifugiert (Heraeus Minifuge) bei 6000rpm, 5min und in dem halben Kulturvolumen SM-Puffer aufgenommen.

Die Bakterienzellen wurden mit λ gt 10 Phagen infiziert und 15min bei 37° C vorinkubiert: Es wurden $2.5 \cdot 10^6$ pfU auf 40 Platten plattiert, das entsprach einem Phagentiter von $6 \cdot 10^4$ pfU pro Platte. Von den vorinfizierten Bakterien wurden 600µL zu 8mL Top-Agar gegeben, mit dem je eine vorgewärmte Agarplatte (0.02% Maltose, Portugal Agar, LB-Medium) überschichtet wurde. Die Platten standen zum Abkühlen etwa 10min bei RT und wurden dann 12-14h bei 37° C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde auf jede Platte nummeriert und ein NC-Filter (Schleicher und Schüll, BA 85, 0.45µm) aufgelegt, an den Phagen und Bakterien adsorbierten. Es wurden von jeder Platte zwei Filter gezogen, um falsch-positive Klone auszuschließen. Mit einer Kanüle einer 2mL Spritze wurden die Filter an den Rändern an drei Stellen durchstoßen, während sie auf den Agarplatten auflagen. So erhielten Filter und Platten Markierungspunkte, die später das Identifizieren der Klone ermöglichten. Die Platten wurden bis zur Auswertung des Screenings und Isolation der positiven Klone bei 4° C im Kühlraum aufbewahrt

Die DNA der Phagen wurde fixiert und gleichzeitig denaturiert für 10min in Denaturierungslösung. Anschließend wurden die Filter 10min in Neutralisierungslösung neutralisiert. Es folgte ein Waschschrift für 5min in 2x SSPE. Die Filter wurden jetzt auf Whatmann 3 MM Papier gelegt und 2h bei 80° C im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Filter in Waschlösung gewaschen (30min, 65° C).

2.2.1.7 Hybridisierung

Die Vorinkubation (Absättigen aller unspezifischer Bindungen des NC-Filters) erfolgte in 120mL Vorhybridisierungslösung 4h bei Hybridisierungstemperatur. Die Hybridisierungstemperatur betrug für die humane FXIII cDNA 60° C, für das Fragment RFXIII 68° C und für das Oligo 1338 55° C. Hybridisiert wurde in 120mL der o.g. Hybridisierungslösung über Nacht, mit 0.09µCi/mL.

Nach der Inkubation wurden die Filter gewaschen: 3x 10min bei RT, 1x 30min bei Hybridisierungstemperatur in Waschlösung II. Die gewaschenen Filter wurden bei 37° C getrocknet, die Markierungspunkte (vgl. 2.2.1.2) der Filter mit einem Rest der Hybridisierungslösung radioaktiv markiert und zur Autoradiographie eingelegt.

2.2.1.8 Vereinzelung positiver Klone aus dem cDNA-Bankscreening

Positive Mischklone wurden isoliert, indem die Autoradiogramme auf einen Leuchttisch gelegt und mit den Platten aus dem Screening anhand von Markierungspunkten und Nummerierung in Deckung gebracht wurden. Es wurden nur Klone vereinzelt, die auf beiden Filtern der Platte positive Signale zeigten. Mit der großen Öffnung einer Pasteurpipette wurde dann der Phagenplaque aus der Agarplatte ausgestochen, in ein Reaktionsgefäß mit 1mL SM-Puffer gegeben und 2h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Phagen in SM-Puffer vorverdünnt (1: 250). 150µL Wirtszellen (C₆₀₀HFL) wurden mit 2µL Phagen infiziert (15min bei 37° C) und erneut plattiert wie unter 2.2.1.6 beschrieben. Mit den Filtern aus dem zweiten Screening wurde verfahren wie unter 2.2.1.7 beschrieben. Mit Hilfe der so erhaltenen Autoradiogramme ließen sich mit der oben stehenden Technik Einzelklone isolieren.

2.2.1.9 Phagen Hybridisierungstest:

Eine Agarplatte mit einem dichten Bakterienrasen von E.coli C₆₀₀HFL wurde mit Hilfe einer Schablone in 36 Felder unterteilt. Auf jedes Feld wurden 2µL Phagensuspension von jedem Klon aufgetropft, der wie unter 2.2.1.8 beschrieben vereinzelt worden war. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutraum inkubiert.

Von dieser Platte wurden zwei Filter gezogen (s. u. 2.2.1.2). Mit den Filtern wurde so verfahren wie unter 2.2.1.7 beschrieben. Im Phagen Hybridisierungstest wurde jeweils gegen ein Oligonukleotid hybridisiert bei 56° C und gegen ein RFXIII-Fragment aus dem ersten Rescreen der Makrophagen cDNA-Bank bei 68°C.

2.2.2 Klonierung:

2.2.2.1 Medien und Puffer

LB-Medium (Luria Bertani Medium, vgl Sambrook et al., (1989))

LB-Medium mit Ampicillin (50µg/ml)

LB-Medium mit Tetracyclin (25µg/ml)

LB-Medium mit Ampicillin und Tetracyclin

SM Puffer (Suspensionsmedium)

0.1M NaCl

0.008M MgSO₄ × 7 H₂O

0.05M Tris

0.01% Gelatine

auf pH 7.5 mit HCl einstellen

TFB I-Puffer:

0.03M Kaliumazetat

0.1M RbCl₂

0.01M CaCl₂

0.05M MnCl₂

15% Glycerin

auf pH 5.8 mit 0.2M

Essigsäure einstellen.

TFB II Puffer:

0.01M PIPES

0.01M RbCl₂

0.075M CaCl₂

15% Glycerin

auf pH 6.5 mit 1M mit KOH einstellen

Puffer für die Arbeitsvorschriften der Firma Qiagen:

Isolation der Phgen DNA:

L1: 20mg/mL RNase A, 6mg/mL DNase I, 0.2mg/mL BSA, 10mM EDTA, 100mM Tris/HCl, 300mM NaCl, pH 7.5

L2: 30% Polyethylenglycol (PEG 6000), 3M NaCl

L3: 100mM Tris/HCl, 100mM NaCl, 25mM EDTA, pH 7.5

L4: 4% Natriumdodecylsulfat (SDS)

L5: 3.0M Kaliumacetat, pH 5.5

QBT: 750mM NaCl, 50mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7.0, 0.15% Triton X-100

QC: 1.0M NaCl, 50mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7.0

QF: 1.25M NaCl, 50mM Tris/HCl, 15% Ethanol, pH 8.5

Isolation von Plasmid DNA:

P1: 100µg/mL RNase A, 50mM Tris/HCl, 10mM EDTA, pH 8.0

P2: 200mM NaOH, 1% SDS

P3=L3 (s.u. 2.6.1)

QBT, QC, QF

2.2.2.2 Bakterienkultur

Herstellung kompetenter Zellen:

50mL LB-Medium wurden mit 5mL einer Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft und bis zu einer $OD_{600}=0.5E$ bei 37° C bebrütet. Dann wurden die Zellen 5min auf Eis gestellt, anschließend bei 3000rpm, 15min, 5° C abzentrifugiert (Hereaus Minifuge). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20mL TFB I resuspendiert. Dann wurden die Zellen 15min bei 0° C inkubiert und wieder bei 3000rpm, 15min, 5° C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2mL TFB II resuspendiert, Zellen portioniert und bei -70°C gelagert

Kultivierung für die Plasmidpräparation:

Bakterienkulturen für die Plasmidpräparation (Kulturvolumen 50-100mL) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37° C inkubiert. Für Mini-Präparationen (Kulturvolumen 4mL) war eine Inkubation von etwa 5 bis 6 Stunden ausreichend.

2.2.2.3 Isolierung der Phagen DNA

Die positiven Phagenklone aus dem cDNA-Bankscreening wurden erneut auf ihren Wirtsbakterien in einer Schüttelkultur angezogen. 50mL frisches LB Medium wurden mit 300µL C600HFL (s.u. 2.2.2.2) und 100µL eines Phageneinzelklons (s.u. 2.2.1.8) angeimpft und über Nacht bei 37° C inkubiert. Die Reinigung der Phagen DNA wurde nach der Methode der Firma QIAGEN: "Qiagen λ Präparation", nach Anweisung des Herstellers durchgeführt:

Arbeitsablauf:

1. Zu einer 50mL über Nacht Kultur wurden 100µL Puffer L1 gegeben und 30 min bei 37° C inkubiert.
2. Dann wurden 10mL eiskühler Puffer L2 dazugegeben und auf Eis 60 min inkubiert.
3. Die Kultur wurde bei 9000rpm (Sorvall, HB4) 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.
4. Das Pellet wurde in 3mL Puffer L3 resuspendiert.
5. Dann wurden 3mL Puffer L4 hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die Lösung wurde 20 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

6. Es wurden 3mL von Puffer L5 hinzugefügt und sofort vorsichtig gemischt. Die Lösung wurde 15min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 4° C zentrifugiert (20000rpm, Sorvall, SS34). Der Überstand wurde sofort abgezogen und erneut 10 min bei 4° C zentrifugiert (20000rpm, Sorvall, SS34). Der Überstand sollte klar und partikelfrei sein.
7. Eine Qiagen-Säule (tip 100) wurde mit 10mL Puffer QBT equilibriert.
8. Der Überstand von Schritt 6 wurde auf die Säule aufgetragen und mit Schwerkraft durch das Gelbett laufen gelassen.
9. Die Säule wurde mit 10mL Puffer QC gewaschen.
10. Die DNA wurde mit 5mL Puffer QF eluiert.
11. Die DNA wurde mit 10.5 mL Isopropanol gefällt und 30 min bei 4° C zentrifugiert (20000rpm, Sorvall, SS34).
12. Das DNA Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und anschließend in Aq. bid. gelöst.

2.2.2.4 Herstellung von Insert und Vektor

Die DNA wurde präparativ mit Eco R1 verdaut, der Verdau auf ein 1% iges TAE-Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese 1h bei 110 V durchgeführt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht($\lambda=346\text{nm}$) ausgewertet.

Vektor DNA und die Eco R1-Fragmente der verschiedenen Klone wurden nach der GENE CLEAN Methode der Firma Bio 100 isoliert:

Die zu isolierende DNA Bande wurde unter UV-Licht Kontrolle aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen und mit der dreifachen Menge (w/w) NaI versetzt. Die Proben wurden in einem Wasserbad bei 45° C inkubiert, bis sich die Agarose aufgelöst hatte.

Diese Lösung wurde mit 5 μL Glasmilch versetzt und 5min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die Suspension in der Eppendorf-Zentrifuge 5415C bei 13000rpm 2min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Glasmilchpellet dreimal mit jeweils 400 μL NEW-WASH gewaschen. Dabei mußte während der Waschschrirte darauf geachtet werden, daß nur 5sec abzentrifugiert wurde, da sich sonst das Glasmilchpellet schlecht wieder resuspendieren ließ. Die Überstände wurden mit einer Pipette abgezogen und verworfen. Das Pellet wurde kurz (5min) unter Vakuum (Speed-vac) getrocknet und dann mit 10 μL H₂O versetzt und bei 50° C 3min inkubiert. Anschließend wurde die Glasmilch wieder abzentrifugiert (13000rpm, 2min). Der Überstand wurde in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben und das Glasmilchpellet erneut mit 10 μL H₂O extrahiert. Die so isolierte DNA konnte direkt in Klonierungseperimente eingesetzt werden.

2.2.2.5 Ligation

Ligation der Fragmente in den Vektor und Transformation in *E. coli* RR₁ erfolgte nach Sambrook et al., 1989.

Die Klonierung von der RXIII-cDNA in verschiedene Expressionsplasmide verlief analog. In diesem Fall war das Ausgangsmaterial die in KS⁻ klonierte cDNA, die mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme aus dem KS⁻-Vektor ausgeschnitten wurde und *blunt end* in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert.

Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen (s.u.), die Fragmente wurden nach der GENE CLEAN Methode (s.o.) isoliert.

2.2.2.6 Plasmidpräparation:

(Firma Qiagen, Hilden)

Arbeitsablauf:

1. Die Bakterienzellen einer frischen Übernachtskultur (50mL) wurden durch eine Zentrifugation (20 min, 6000rpm, 4°C, Minifuge GL, Heraeus Christ) geerntet.
2. Das Bakterienpellet wurde in 4mL Puffer P1 aufgenommen.
3. Puffer P2 wurde hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die Zellsuspension wurde 5min bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Die Zellsuspension wurde mit 4mL gekühltem Puffer P3 versetzt, sofort vorsichtig gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert.
5. Danach wurde 20 min, 20000rpm, 4°C, Sorvall, SS34 zentrifugiert.
6. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (10 min, 20000rpm, 4°C, Sorvall, SS34). Der Überstand wurde sofort auf eine equilibrierte (4mL QBT) Qiagen-tip 100-Säule aufgetragen und mittels Schwerkraft in das Gelbett laufen gelassen.
7. Die Säule wurde zweimal mit jeweils 10mL Puffer QC gewaschen.
8. Die DNA wurde mit 5mL Puffer QF eluiert.
9. Die DNA wurde mit 3.5mL Isopropanol gefällt und anschließend abzentrifugiert (30min, 6000rpm, Minifuge GL, Heraeus Christ)
10. Das DNA-Pellet wurde mit kaltem 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.
11. Die DNA wurde in Aq. bid. gelöst.

2.2.3 Sequenzierung:

Radioaktive Sequenzierungen wurden nach Sanger (1977) mit dem Sequenase-Kit der Firma USB (United States Biochemical) durchgeführt.

Zusätzlich wurde mit dem Sequenzierautomaten der Firma Applied Biosystems sequenziert zum einen, wenn Bereiche der Sequenz mit der radioaktiven Methode schwierig zu sequenzieren waren und zum anderen, um die ersten Sequenzierungen zu überprüfen.

Die verwendeten Oligonukleotide aus der humanen FXIII-Sequenz sind aus Tabelle 3 zu entnehmen.

Die Sequenz mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz wurde auf einem VAX-System mit der Software der University Wisconsin Computer Group erstellt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden im Labor Dr. Grundmann mit einem Biosearch DNA Synthesizer 8750 hergestellt.

Tabelle 3: Liste der von der humanen FXIII cDNA abgeleiteten Oligonukleotide (zur Verfügung gestellt von Dr. Grundmann, Behringwerke)

| Nummer | Position (auf der rhu-FXIII cDNA) | Basensequenz von 5'- 3' | Verwendung |
|--------|---|---|--------------------|
| 1338 | +211-+249 | CATAGAATTCCTTAATGTCACG AGCGTTCACCTGTTCAA | PCR, Screening |
| 2380 | +347-+351 | TCAGATTGACTTCAATC | Sequenzierung |
| 1337 | +400-+370 | TGACGAATTCCACCCTGAAGA GATCCCTTCT | PCR, Sequenzierung |
| 1121 | +598-+614 | CGAACCAGTCGAAACCC | PCR, Sequenzierung |
| 1122 | +869-+884 | GTGGGGTCTGCAATGGT | Sequenzierung |
| 2381 | 949-+966 | GATGGAAGGGATCCGTA | Sequenzierung |
| 1123 | 1192-1212 | GTGTGGAACCTACCACTGCTGG | Sequenzierung |
| 1124 | +1495-+1513 | GGAGGAGATGGCATGATGG | PCR, Sequenzierung |
| 2382 | +1669-+1685 | GTGCTGGGAAAAGACTT | Sequenzierung |
| 2383 | +1767-+1753 | TGTAGAAGGTGATGTTG | Sequenzierung |
| 1125 | +1814-+1832 | CGCTGGAGCCCTTGTCCTT | PCR, Sequenzierung |
| 2379 | +2152-+2169 | GTGCAGTGGGAAGAAGT | Sequenzierung |
| 2384 | +2491-+2507 | TCCACCCTCCAAAGGGT | Sequenzierung |

2.2.4 Hefeexpression

2.2.4.1 Hefekultur und Fermentation

Medien und Puffer:

YPD-Medium (Vollmedium, 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Dextrose)

YNB-Medium (Minimalmedium, 0.67% Hefe-Stickstoffquelle ohne Aminosäuren, 2% Dextrose, 0.2% der erforderlichen Aminosäuren in Abhängigkeit von den genetischen Markern)

20%ige Glucose

20%ige Galaktose in YPD

Waschpuffer:

0.02M Tris

0.002M EDTA, pH 7.5

Transformationspuffer:

0.2M LiCl

0.02M Tris

0.002M EDTA, pH 7.5

Aufschlußpuffer

0.1M Tris/HCl, pH 7.5

Kultivierung: Die Stammhaltung der Hefestämme erfolgt auf Agarplatten mit YPD-Vollmedium. Für die Hefetransformation wurden 50mL YPD-Vollmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30° C inkubiert. Die Transformanden wuchsen auf Minimalmedium (YNB), dem die Aminosäuren zugesetzt wurden, für die der Stamm auxotroph war. Die Kultivierung der transformierten Klone erfolgte in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 30° C auf dem Schüttler. Die Wachstumsbedingungen wurden gewählt wie bei Sherman et al 1983 und Bröker et al 1991 beschrieben.

Fermentation: Die Fermentation des RFXIII Produktionsstammes erfolgte nach den Bedingungen, die für die Produktion des humanen Faktor XIII in demselben Organismus vom Labor Dr. Grote der Behringwerke erarbeitet worden waren (nicht publizierte Ergebnisse).

2.2.4.2 Transformation in Hefe:

Mit einer Einzelkolonie *Saccaromyces cerevisiae* CI3ABYS86 aus der Stammhaltung wurden 30mL YPD- Medium angeimpft mit und über Nacht bei 30° C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Hefekultur 1:5 mit frischem YPD Medium verdünnt und für 3-4h bei 30° C auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (5min, 3000rpm, Hereaus Labofuge) und im halben Kulturvolumen Waschpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (s.o.) und das Zellpellet aus 50mL Kultur in 300µL Transformationspuffer aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend 1h bei 30° C inkubiert. Nach der Inkubation wurden zu 100µL der Zellsuspension die DNA gegeben (maximal 10µL Volumen, nicht mehr als 10 µg DNA Menge insgesamt). Wieder wurde die Suspension 30min bei 30° C inkubiert. Anschließend wurden 700µL 40%iges PEG 4000 (in Transformationspuffer) zu den Zellen gegeben und ein Hitzeschock (15min, 42° C) durchgeführt. Dann wurden die Zellen auf YNB-Platten ausplattiert, denen die Aminosäuren zugesetzt waren, für die die Hefezellen auch nach der Transformation noch auxotroph sein mußten.

2.2.4.3 Klonscreening:

Kultivierung: Die Klone aus der Hefetransformation wurden in YNB-Medium unter Selektionsbedingungen angezogen: Die Klone wuchsen auf Minimalmedium an, dem nur die Aminosäuren zugesetzt waren, für die Zellen auch nach der Transformation auxotroph waren. Nach 48h Vorkultur wurden die Klone als Hauptkultur weitergeführt. Dazu wurden die Vorkulturen 1:10 mit YPD-Medium verdünnt, dem 2% Glucose und 2% Galaktose (als Induktor) zugesetzt waren. Die Hauptkultur wuchs 48h und wurde dann mit 20%iger Galaktose gefüttert (im Medium 1:10 verdünnt). Nach 24h Inkubation wurden die Zellen aufgeschlossen.

Zellaufschluß: Von der Hauptkultur wurden 10mL Kultur abgenommen und bei 3000rpm, 5min, RT (Hereaus, Labofuge) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10mL Aufschlußpuffer resuspendiert und wieder abzentrifugiert (s.o.). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet ohne Zugabe von Puffer wieder gelöst. Die Zellsuspension wurde dann in ein Reaktionsgefäß gegeben, in das Glasperlen vorgelegt worden waren. Mit Aufschlußpuffer wurde das Gesamtvolumen auf etwa 1.5mL eingestellt. Die Zellen wurden 20min in einer Zelmühle aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluß wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (13000rpm, 5min, 4° C, Sorval, SS 34). Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen, Zellen und Glasperlen wurden verworfen. Der so gewonnene Rohextrakt wurde im Berichromtest® auf Aktivität untersucht.

2.2.5 Proteinreinigung von rekombinantem Ratten FXIII aus *Saccharomyces cerevisiae* Cl₃Abys86:

Herstellung des Rohextraktes: Die Hefezellen wurden nach einer Fermentationsdauer von 72h geerntet. Sie wurden in der French Pressure Cell bei einem Druck von 1000 bar aufgeschlossen. Das Lysat wurde mit 3% PEG 6000 versetzt, um die Fällung von groben Bestandteilen des Lysates zu erleichtern und dadurch die Effektivität des anschließenden Zentrifugationsschritts zu verbessern. Unterblieb die Fällung mit PEG 6000, verstopfte die erste Ionenaustauschersäule im Reinigungsverfahren. Der Rohextrakt wurde über 0.45µm filtriert, der durchschnittliche Proteingehalt lag bei 20mg/mL mit einer Aktivität von 5E (~44µg)/mL. Die spezifische Aktivität lag etwa bei 0.25E/mg(~2.2µg/mg).

1. Einstellung von pH-Wert und Leitfähigkeit.

Der pH-Wert des Rohextraktes wurde auf pH 7.8 mit 1M NaOH eingestellt und die Leitfähigkeit über Ultrafiltration oder Verdünnen auf < 10 mS/cm eingestellt.

Das Lysat wurde über Nacht bei 4° C stengelassen und dann scharf abzentrifugiert. (1h bei 10000rpm, Beckmann J 21, Rotor JA 14). Der Überstand wurde dann auf eine DEAE-EMD Fractogel (Merck) Säule mit 80mg Protein pro mL Gelbett aufgetragen.

2. DEAE Chromatographie:

Puffer 1: 0.02M K₂HPO₄/HCl, pH 7.8

Puffer 2: 0.02M K₂HPO₄/HCl, pH 7.8 + 0.2M KCl

Puffer 3: 0.02M K₂HPO₄/HCl, pH 8.0 + 0.5M KCl.

Die Säule war mit Puffer 1 equilibriert. Der Rohextrakt wurde mit konstantem Fluß auf die Säule aufgetragen, die Flußgeschwindigkeit betrug 17cm/h. Dann wurde mit Puffer 2 gespült, bis eine OD₂₈₀ =0 erreicht war. Eluiert wurde mit einem Gradienten von 0.02M K₂HPO₄/HCl, pH 7.8 + 0.2M KCl bis 0.02M K₂HPO₄/HCl, pH 8.0 + 0.5M KCl. Die Flußrate beim Waschen und Eluieren betrug 33cm/h.

Die gesammelten Fraktionen wurden auf Aktivität im Berichromtest® getestet und die Fraktionen mit FXIII Aktivität gesammelt

3. Ammoniumsulfatfällung:

Das Eluat wurde langsam auf eine Ammonsulfatkonzentration von 30 g pro 100mL eingestellt und mindestens 12h bei 4° C inkubiert. Der Niederschlag wurde hochtourig abzentrifugiert (20000rpm, 4°C, 45min, Beckmann J 21, Rotor JA 20).

4. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC):

Puffer 1: 0.02M K_2HPO_4/HCl , pH 8.0 + 0.83M Na_2SO_4 ,

Puffer 2: 0.02M K_2HPO_4/HCl , pH 8.0 + 0.38M Na_2SO_4 ,

Puffer 3: 0.02M K_2HPO_4/HCl , pH 8.0

Der Ammoniumsulfatniederschlag wurde in wenig Puffer 1 gelöst und mit einer Proteinkonzentration von 2mg/mL Gelbett auf eine Phenylsepharosesäule (Pharmacia, HP) aufgetragen. Die Flußgeschwindigkeit: betrug 19cm/h. Gewaschen wurde mit Puffer 2 mit einer Flußrate von 38cm/h, bis eine $OD_{280}=0$ erreicht war. Eluiert wurde mit einem abfallenden Gradienten von 0.38M Na_2SO_4 bis 0M Na_2SO_4 . Die Fraktionen wurden im Berichromtest® auf Aktivität bestimmt und mit der BCA Methode (PIERCE) die Proteinbestimmung durchgeführt. Die Fraktionen, die eine spezifische Aktivität von mehr als 20E/mg aufwiesen, wurden gesammelt.

5. Fällung am isoelektrischen Punkt:

Puffer 1: 0.02M K_2HPO_4/HCl , pH 8.0

Puffer 2: 0.02M Citratpuffer, pH 5.0,

Das Eluat aus der HIC wurde ankonzentriert (Amiconzelle) auf einen Proteingehalt von etwa 5mg/mL. Gleichzeitig wurde das Konzentrat durch das wiederholte Auffüllen mit Puffer 1 entsalzt. Dieser erste Dialyseschritt diente nur der Ankonzentrierung der Probe. Salzkonzentration und pH-Wert sollten zu diesem Zeitpunkt das Protein stabilisieren und in Lösung halten. Dieser Arbeitsschritt wurde möglichst rasch und bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde die Proteinprobe gegen Puffer 2 bei 4° C, 24-36h dialysiert. Der pH-Wert des Puffers mußte kontrolliert werden, sobald sich der Puffer auf 4° C abgekühlt hatte. Während dieser Dialyse -im sauren Bereich, nahe des isoelektrischen Punktes- fällt RFXIII aus. Diese zweite Dialyse in der Kälte ist also der eigentliche Reinigungsschritt. Nach der Dialyse wurde der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand auf Aktivität kontrolliert. Das Pellet wurde vorsichtig so konzentriert wie möglich in Puffer 1 gelöst, der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls auf pH 8.0 eingestellt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde auf Aktivität im Berichromtest® und auf Proteingehalt wie beschrieben untersucht.

6. Cellufine Chromatographie:

Puffer: 0.02M K_2HPO_4/HCl , pH 8.0 + 0.2M KCl.

Der gelöste Niederschlag aus der Fällung am isoelektrischen Punkt wurde auf Cellufine (Amicon) aufgetragen: Probenvolumen nicht mehr als 10% des Bettvolumens, Protein maximal 50 E/mL Gel, Flußgeschwindigkeit: 12cm/ h.

In den Fraktionen wurde Proteinkonzentration und FXIII Aktivität nach den bereits beschriebenen Methoden bestimmt. Die Peakfraktionen wurden nach spezifischer Aktivität vereinigt und bei -70°C gelagert.

2.2.5.1 SDS Elektrophorese und Western Blot:

Puffer 1 (Blotpuffer): 39mM Glycin, 48mM Tris, 0.0375% SDS, 20% Methanol

Puffer 2: PBS/0.05%TWEEN 20 mit 3% BSA

Puffer 3: PBS/0.05%TWEEN 20 mit 1% BSA.

Puffer 4: PBS/0.05%TWEEN 20

Substrat für alkalische Phosphatase: BCIP 2mg in 100µl DMSO;

NBT in 50mM Amino-methyl-propan-diol, 5mM $MgCl_2$, 0.01mM $ZnCl_2$, pH 9.7

kurz vor der Färbung des Blots wurde die BCIP-Lösung im Verhältnis 1:100 mit der NBT-Lösung gemischt.

SDS Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Das Trenngel enthielt 7.5-20% Acrylamid, das Sammelgel 3%. Die Trennung wurde mit dem Midget-System der Firma LKB bei einer Stromstärke von 10 mA zum Einlaufen der Proben und 20 mA während der Trennung durchgeführt. Geblottet wurde in einem Semi-dry Verfahren mit einem Nova-Blot Gerät der Firma LKB, die Stromstärke betrug 0.4 A/cm² (=50 A/ Gel). Der Blotpuffer war ein Tris/Glycin Puffer (Puffer 1). Nach dem Blot wurden alle unspezifischen Proteinbindungskapazitäten der Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll, 0.45 µm) mit Puffer 2 abgesättigt. Die Blotmembran wurde dazu 30min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper inkubiert: 10 µg Antikörper/mL in Puffer 3. Für den Nachweis von RFXIII wurde ein monoklonaler Antikörper (FXIII-18) der Behringwerke (Labor Dr. Hock) gegen humanen rekombinanten FXIII eingesetzt. Zum Nachweis der Hefeproteine wurde ein Antiserum der Behringwerke (Labor Dr. Friesen) aus Kaninchen eingesetzt, das gegen ein Lysat untransfizierter Zellen des Produktionsorganismus gerichtet war. Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 4° C oder bei Raumtemperatur über 2h auf einem Schüttler. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Blot 3x für je 5min gewaschen mit Puffer 4 bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen wurde die Blotmembran mit dem Nachweis-Antikörper inkubiert. Die Inkubationsbedingungen waren dieselben wie für den

ersten Antikörper. Es wurden zwei verschiedene Nachweis-Antikörper verwendet: Ziege-anti-Maus (Bio-Rad) und Esel-anti-Kaninchen (Dianova), jeweils mit alkalischer Phosphatase konjugiert. Diese Antikörper wurden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Anschließend wurde der Blot 3x 5min in Puffer 4 gewaschen und danach mit dem Substrat für alkalische Phosphatase inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abspülen der Membran mit Aq. bidest gestoppt.

Gesamtprotein-Färbungen wurden entweder am nicht geblotteten SDS- Gel mit Coomassie-blue (0.5% w/v Servablau R 250, 10% v/v Essigsäure, 45% v/v Methanol) oder am Blot mit der Auro dye TM Färbung der Firma Janssen durchgeführt. Für die Coomassie Färbung wurde das Gel 1h in der oben genannten Färbelösung bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurde es in der Entfärbelösung (10% v/v Essigsäure, 25% v/v Methanol) so lange gewaschen, bis der Hintergrund klar war. Die Auro dye-Färbung wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

2.2.5.2 Nativ Elektrophorese:

Sammelgelpuffer: 0.124M Tris/HCl, pH 6.7 + 0.05% NaN_3

Trenngelpuffer: 0.75M Tris/HCl, pH 8.9 + 0.05% NaN_3

APS-Stammlösung: 15mg/mL

Puffer zum Einlaufen der Proben: Trenngelpuffer mit Aq. bid. 1:12 verdünnt.

Elektrophoresepuffer: 0.1M Tris, 0.76M Glycin, 0.05% NaN_3

Probenpuffer: 0.01% Bromphenolblau, 50% (w/v) Saccharose, 0.05% NaN_3

Blotpuffer: 0.0156M Tris, 0.12M Glycine

Färbelösung 1: 1g Serva blue G/l

Färbelösung 2: 300g NH_4NO_3 ad 900mL Aq. bid, + 20mL HNO_3 (65%) ad 1000mL mit Aq.bid.

Fixierlösung: 880mL Aq. bid, 100mL Ethanol, 10mL Färbelösung 1, 10mL HNO_3 (65%)

gebrauchsfertige Färbelösung: 25mL Färbelösung 1 + 50mL Färbelösung 2

Entfärber: 50mL Färbelösung 2 ad 1000mL mit Aq. bid.

Zusammensetzung des Sammelgels: 2.5mL Rotiphorese 30 (Roth)

6.5mL Aq. bid.

10mL Sammelgelpuffer

1mL APS- Stammlösung

30 μ L TEMED

Trenngelzusammensetzung: 10.5mL Rotiphorese 30

7.5mL Aq. bid.

20mL Trenngelpuffer

2mL APS-Stammlösung

60µL TEMED

2g Saccharose

Elektrophorese: Am negativen Pol des Gels wurde zunächst der Puffer zum Einlaufen der Proben in den Puffertank der Elektrophoresekammer (vertikale Elektrophoresekammer der Firma Bio-Rad) gefüllt, am positiven Pol wurde der Elektrophoresepuffer verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 50 mA durchgeführt und dabei auf 16° C gekühlt. Nach etwa 30min waren alle Proben in das Trenngel eingelaufen und der Puffer am negativen Pol wurde gegen Elektrophoresepuffer ausgetauscht.

Färbung: Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde das Gel entweder geblottet, oder gefärbt. Zum Färben wurde es zuvor 2h in die Fixierlösung gelegt und auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde das Gel für 24h bei RT in der Färbelösung gefärbt. Das Entfärben war nur bei einer zu starken Färbung des Hintergrundes nötig.

2.2.5.3 Isoelektrische Fokussierung:

Zusammensetzung der Gele (5% Acrylamid):

| | |
|--|-------------------|
| Acrylamid: Methylenbisacrylamid (50:1) | 3.5mL |
| Ampholyte pH 3.5 - 9.5 | 0.1mL (Pharmacia) |
| Ampholyte pH 5.0 - 7.0 | 2.5mL (Pharmacia) |
| 10M Harnstoff: | 7mL |
| Aq. dest | ad 35mL |

Elektrophorese:

Vorfokussierung: 35 W/80min

Hauptfokussierung: 35 W/94min

Färbung:

Coomassie Färbung wie unter 2.12.2 beschrieben

Silberfärbung:

Das Gel wurde über Nacht in Aq.dest gewaschen. Dann wurde der pH-Wert des Gels auf einen Wert zwischen 4 und 5 eingestellt. Dazu wurde es 1h bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 10% Ethanol, 0.1% Na-Acetat, 0.01% Formaldehyd und 0.1% SDS inkubiert. Anschließend

wurde es für 1h bei Raumtemperatur mit Silbernitrat inkubiert (0.1% Silbernitrat, 0.01% Formaldehyd). Danach wurde das Gel kurz (5min) in Wasser gewaschen. Entwickelt wurde das Gel in einer 2.5% igen Na_2CO_3 Lösung mit 0.01% Formaldehyd. Nach dem Entwickeln wurde das Gel kurz mit Wasser abgespült und der Entwicklungsvorgang mit 1.5% iger Essigsäure gestoppt.

Blot: Der Blot von isoelektrischen Fokussierungen wurde als "Abklatschblot" durchgeführt. Dazu wurde eine Blotmembran auf das Gel gelegt und dort 15min inkubiert. Nach dem Abziehen der Blotmembran wurde so weiter verfahren wie unter 2.12.1 beschrieben.

Bestimmung des Isoelektrischen Punktes:

Mit einer vorkalibrierten Elektrode wurde nach beendeter Elektrophorese im 1 cm Abstand auf der Geloberfläche die Spannung gemessen (mV) und in pH-Werte umgerechnet. Anhand der erstellten Eichkurve konnte über die Wanderungsstrecke der isoelektrische Punkt der unbekannten Probe bestimmt werden.

2.2.5.4 Aktivitätstest:

Die Enzymaktivität von RFXIII wurde in einem Aktivitätstest bestimmt, der als standardisierter Enzymtest für humanen FXIII eingesetzt wird. Der Berichromtest® (Fickenscher, 1991, Heins et al., 1994) ist ein kinetischer Test, der die Abnahme von NADH/H^+ im Medium registriert. Der ermittelte Wert kommt durch den Betrag an Extinktionseinheiten zustande, um den die Extinktion während einer konstanten Inkubationszeit gefallen ist. Im Aktivitätstest ist eine Einheit die Extinktionsänderung, die im Test von humanem randomisiertem Spenderplasma gemessen wird.

Für den Test wurden die Proben auf etwa eine Einheit RFXIII-Aktivität vorverdünnt mit 0.5% BSA in physiologischer Kochsalzlösung. Von dieser Verdünnung wurden 70 μL in den Test eingesetzt. Für Routinetests wurde eine Vorinkubation von 5min gewählt, für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde der lineare Bereich der Enzymaktivität bestimmt und die Vorinkubation entsprechend verlängert.

2.2.5.5 Proteinbestimmungen:

Für Proteinbestimmungen der Fraktionen am Anfang des Reinigungsschemas wurde die Differenzmessung über optische Dichte durchgeführt. Die Proben wurden bei 280/320 nm im Photometer (Uvikon 820, Kontron) gemessen. Der Wert bei 320 nm wurde von dem Wert bei 280 nm abgezogen. Bei einer $\text{OD}_{280} = 1$ wurde mit einer Proteinmenge von 1mg/mL gerechnet.

Bei reineren Fraktionen, das waren Fraktionen nach der HIC, wurde mit einer Proteinbestimmung nach der BCA Methode der Firma Pierce gearbeitet. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5.6 Fremdproteinbestimmung durch ELISA

Puffer:

Verdünnungspuffer für Proben, Standard und Konjugat: OURF 93, Behringwerke, Marburg

Waschpuffer: OSEW 96, Behringwerke, Marburg

Substratpuffer: OSEZ, Behringwerke, Marburg

Stopplösung: OSFA 96 Behringwerke, Marburg

Prinzip: Sandwich-ELISA: Eine Mikrotiterplatte wird mit einer definierten Menge eines polyklonalen Antiserum gegen den Produktionsorganismus beschichtet. An die gebundenen Antikörper bindet das zu bestimmende Protein. Nachgewiesen wird wieder mit einem polyklonalen Antikörperserum gegen den Produktionsorganismus, das an das bereits gebunden Fremdprotein bindet. Dieser ELISA wurde durch einen Standard quantifizierbar, der in unterschiedlichen Verdünnungsstufen mit den Proben gemessen wurde und dessen Hefeproteinanteil bekannt war, da eine nicht transformierte Hefekultur des Produktionsorganismus den Standard lieferte.

Das rekombinante Protein, das in den Proben enthalten ist, wird nicht mit erfaßt, da es an die Platte nicht binden kann. Da nur eine kleine Menge von Antikörpern an die Platte binden kann, besteht die Gefahr, den Test zu überladen. Wird mehr Fremdprotein auf die Platte gegeben, als Bindungsmöglichkeiten vorhanden sind, erhält man zu geringe Werte, da das nicht gebundene Fremdprotein bei den Waschschritten mit abgewaschen wird. Zusätzlich sind nicht alle Proteine der Hefezelle gleich immunogen, so daß sicherlich ein kleiner Teil des Fremdproteins vom Test übersehen werden kann. So eignet sich dieser ELISA nur für Proben, die von vornherein als hoch gereinigt anzusehen sind. Daher wurde hier das Endprodukt der RFXIII-Reinigung getestet.

Vom Standard (s. unter "Material") wurde eine Verdünnungsreihe von 40ng/mL bis zu 0.625ng/mL in 1:2 Verdünnungsstufen hergestellt. Dann wurden die Proben vorverdünnt, um in den Meßbereich des Testes zu kommen. Diese vorbereiteten Proben wurden in vier Verdünnungsstufen um den Faktor 3 weiter verdünnt. Anschließend wurde das Konjugat (s. unter "Material") auf eine Konzentration von 1µg/mL eingestellt. Danach wurde das Substrat in 11mL Substratpuffer gelöst und der Waschpuffer mit Aq. dest. 1:20 verdünnt.

Je 100µL jeder Probe und des Standards wurden in die Wells der Mikrotiterplatte (s. unter "Material") pipettiert und 60 min bei 37° C inkubiert. Nach dem Absaugen der Überstände wurde die Platte mit 100µL Waschpuffer pro Well viermal gewaschen. Danach wurde 100µL

Konjugatverdünnung pro Well auf die Mikrotiterplatte gegeben und wieder bei 37° C 60min inkubiert.. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurde wieder gewaschen wie oben beschrieben. Nach dem Waschen wurden 100µL Substratlösung pro Well auf die Platte gegeben und 30min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 100µL Stopplösung pro Well gestoppt und die Extinktion bei 492 nm im Mikrotiterreader gemessen.

2.2.5.7 Molekulargewichtsbestimmung durch HPLC

Puffer: 0.067M ortho Phosphorsäure

0.1M NaCl

0.5g Natriumazid

ad 1000mL mit Aq. bid., pH 7.2, sterilfiltriert

Säule: TSK G3000SWXL, Supleco, 300mm × 7.5mm

Die HPLC-Trennung wurde unter isokratischen Bedingungen durchgeführt. Protein wurde bei 280nm detektiert, die Flußrate betrug 0.5mL pro Minute. Es wurden 50µL Probe injiziert.

Die Säule lief mit einem Druck von 30bar.

3. Ergebnisse:

3.1 cDNA-Bankscreening, Klonierung und Sequenzierung:

3.1.1 cDNA-Bankscreening:

Um bei einem cDNA Bankscreening den gesuchten cDNA Abschnitt zu finden, muß die Bank wiederholt gescreent werden. Zunächst wurden die Phagen in hoher Dichte auf ihren Wirtsbakterien ausgesät, dabei war es wichtig einen Überblick über die Bank zu bekommen und festzustellen, ob der gesuchte DNA Abschnitt überhaupt in der Bank vertreten war. Ein daran anknüpfendes 2.Screening (1. Rescreen), diente dazu die gefundenen Mischklone zu vereinzeln. In einem 3.Screening (2. Rescreen) ließen sich die Hybridisierungsbedingungen variieren, um so noch spezifischer nach dem fraglichen DNA Abschnitt zu suchen. Das erste cDNA-Bankscreening wurde mit einem hohen Phagentiter von 8×10^8 pfu/mL, das entspricht 5×10^4 pfu/Platte plattiert (vgl. Material und Methoden 2.2.1.6). Es konnten schon im ersten Screening 24 positive Mischklone isoliert werden, die mit der Sonde FXIII p130 reagierten. Diese Sonde war ein Konstrukt aus einem Plasmid und der vollständigen rhu FXIII cDNA. Dadurch, daß mit einem so großen homologen DNA Abschnitt gesucht werden konnte, war es möglich die Hybridisierung bei 60° C durchzuführen und so die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von falsch positiven Klonen zu vermindern (vgl. Material und Methoden 2.2.1.7). Im zweiten Screening wurden die Mischklone vereinzelt, indem der Titer der isolierten Klone um $1:2 \times 10^4$ verdünnt wurde. (vgl. Material und Methoden 2.2.1.8). Die Hybridisierungsbedingungen wurden konstant gehalten. Durch den geringeren Titer war es nun möglich 44 Einzelklone zu isolieren und sie einer Analyse zu unterziehen: Zunächst wurden die Klone im Phagen Hybridisierungstest überprüft. 19 von den Einzelklonen reagierten erneut positiv mit ihrer Sonde aus dem Screening. Diese Klone wurden einem präparativen Eco RI Restriktionsverdau (s. Abb.:2) unterzogen, weil die cDNA Inserts über Eco RI Schnittstellen in die Phagen DNA ligiert worden waren. Da sich nicht alle Klone mit Eco RI verdauen ließen, blieben nur 6 Klone übrig aus denen Inserts zu isolieren waren. Im PAA-Gel ließen sich Fragmente von 1200 bis 2000bp beobachten. Die über Elektroelution gewonnenen cDNA Fragmente wurden in den KS- Vektor ligiert und in E.coli RR1 transformiert. Nach der Identifikation der Bakterienklone über einen erneuten Eco RI Restriktionsverdau wurden sie ansequenziert. Dazu wurden die kommerziellen Primer (KS Primer, revers Primer) benutzt. Allen gefundenen Klonen fehlten große Stücke aus dem 5' Bereich der cDNA. Der längste Klon (RFXIII KS 2/4) startete erst bei Position +738 der humanen FXIIIa Sequenz. So wurde ein zweites Screening (s. Abb.:3) der Mischklone nötig um eventuell einen vollständigen Klon zu erhalten, oder zumindest Klone zu bekommen, die den Anfangsteil der Sequenz enthielten. 17 weitere Mischklone wurden noch einmal einem Screening unterzogen. Der Titer wurde erneut um $1:2 \times 10^4$ verdünnt. Nun wurden die Hybridisierungsbedingungen variiert: als Sonde diente der längste Klon (RFXIII KS 2/4) aus dem zweiten Screening und ein Oligo (Nr. 1338, vgl. Tabelle 3). Mit diesem Oligo hatte es in

PCR-Vorversuchen schon positive Signale gegeben und es hybridisierte an der Position 211-240 der humanen Sequenz. Dann wurde die Hybridisierungstemperatur für das cDNA Fragment auf 68° C heraufgesetzt, mit dem Oligo wurde bei 56° C hybridisiert. Aus diesem Screening wurden 29 Klone isoliert und über einen erneuten Phagen Hybridisierungstest identifiziert, indem die Einzelklone mit beiden Sonden aus dem dritten Screening hybridisiert wurden. In diesem Phagen Hybridisierungstest (Abb.:4) wurden 15 Einzelklone aus dem zweiten Screening untersucht, da dieser Test den Vorteil bot, viele Klone schnell untersuchen zu können und so sicher einen vollständigen cDNA Klon zu erhalten. Es reagierten 13 Klone positiv mit beiden Sonden aus dem Screening. Aus drei Klonen ließ sich über den präparativen Eco RI Verdau (Abb.:5) ein Insert gewinnen. Wie im zweiten Screening wurden die Inserts wieder in KS⁻ kloniert und ansequenziert (s.o.). Einer der jetzt gefundenen Klone (71/8) enthielt die vollständige translatierte cDNA Sequenz von RFXIII.

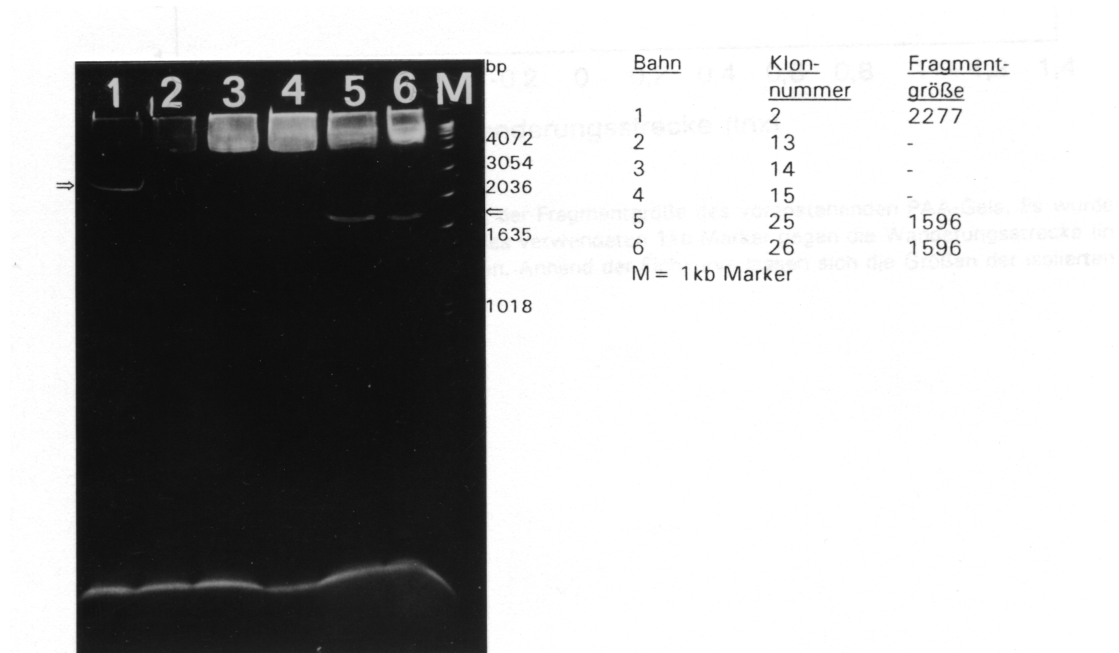


Abbildung 2:

Präparative Polyacrylamid (8%) Elektrophorese nach Eco RI Verdau von Einzelklonen aus der cDNA-Bibliothek. Auf dem Gel lassen sich sehr gut die Größen der DNA Fragmente unterscheiden. Eichkurve zu dem oben gezeigten PAA Gel siehe Abbildung 2a. Bahnen zwei bis vier zeigen Klone, die sich nicht mit Eco RI schneiden ließen, obwohl sie im Screening und im Phagen-Hybridisierungstest (vgl. Material und Methoden 2.2.1.6-2.2.1.9) positiv mit ihrer Sonde (rhu FXIII cDNA) reagierten. Die Pfeile kennzeichnen die gewonnen Fragmente. Nach einer Elektroelution wurden die Fragmente kloniert und ansequenziert. Das Fragment auf Bahn 1 wurde für ein weiteres Screening verwendet (s.u. Ergebnisse 3.1.1).

Eichkurve des präparativen Gels zur Bestimmung der Fragmentgröße

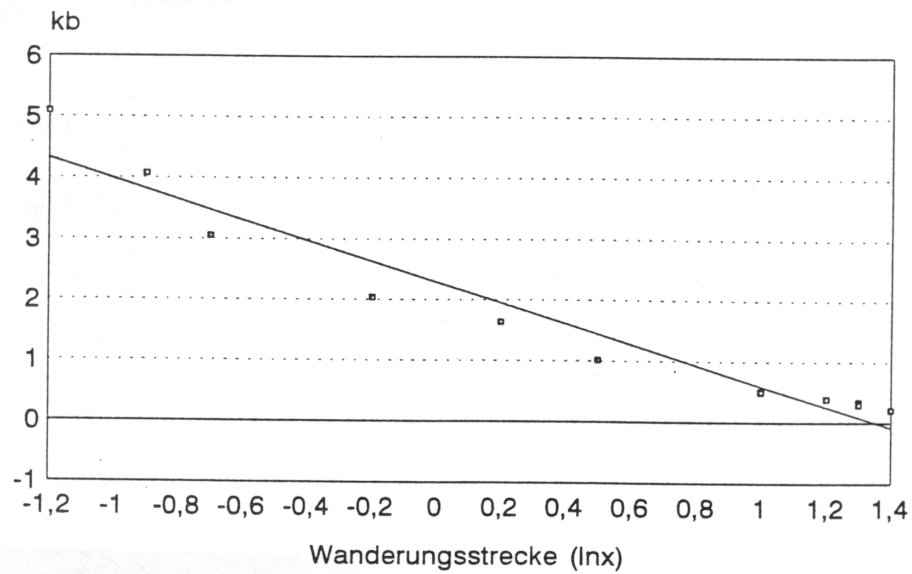


Abbildung 2a: Eichkurve zur Ermittlung der Fragmentgröße des voranstehenden PAA-Gels. Es wurde die Länge der Markerfragmente (in kb) des verwendeten 1kb Marker gegen die Wanderungstrecke (in cm) im Gel halblogarithmisch aufgetragen. Anhand der Eichkurve lassen sich die Größen der isolierten cDNA Fragmente bestimmen.

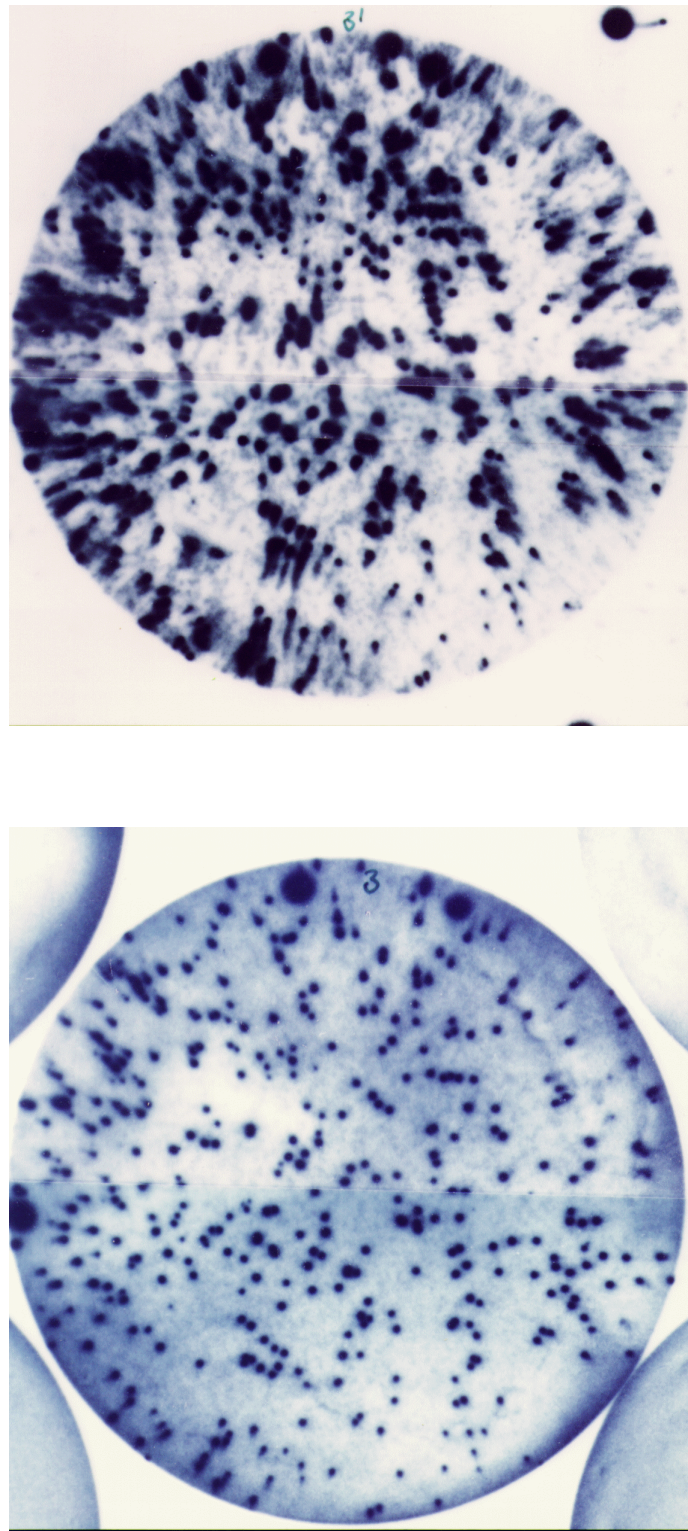


Abbildung 3: Drittes Screening der Ratten-Makrophagen-cDNA-Bibliothek. In diesem Screening wurden Einzelklone aus dem vorangegangenen Screening mit zwei Sonden, einem RFXIII Fragment (Klon 2/4) und einem Oligonukleotid (Nr.:1338) untersucht, um einen vollständigen RFXIII cDNA Klon zu erhalten. Für nähere Informationen siehe Material und Methoden 2.2.1.6-2.2.1.9 und Ergebnisse 3.1.1 Das obere Bild zeigt einen Filter, der mit dem RFXIII Fragment hybridisiert wurde, das untere Bild einen Filter, der mit dem Oligo hybridisiert wurde.

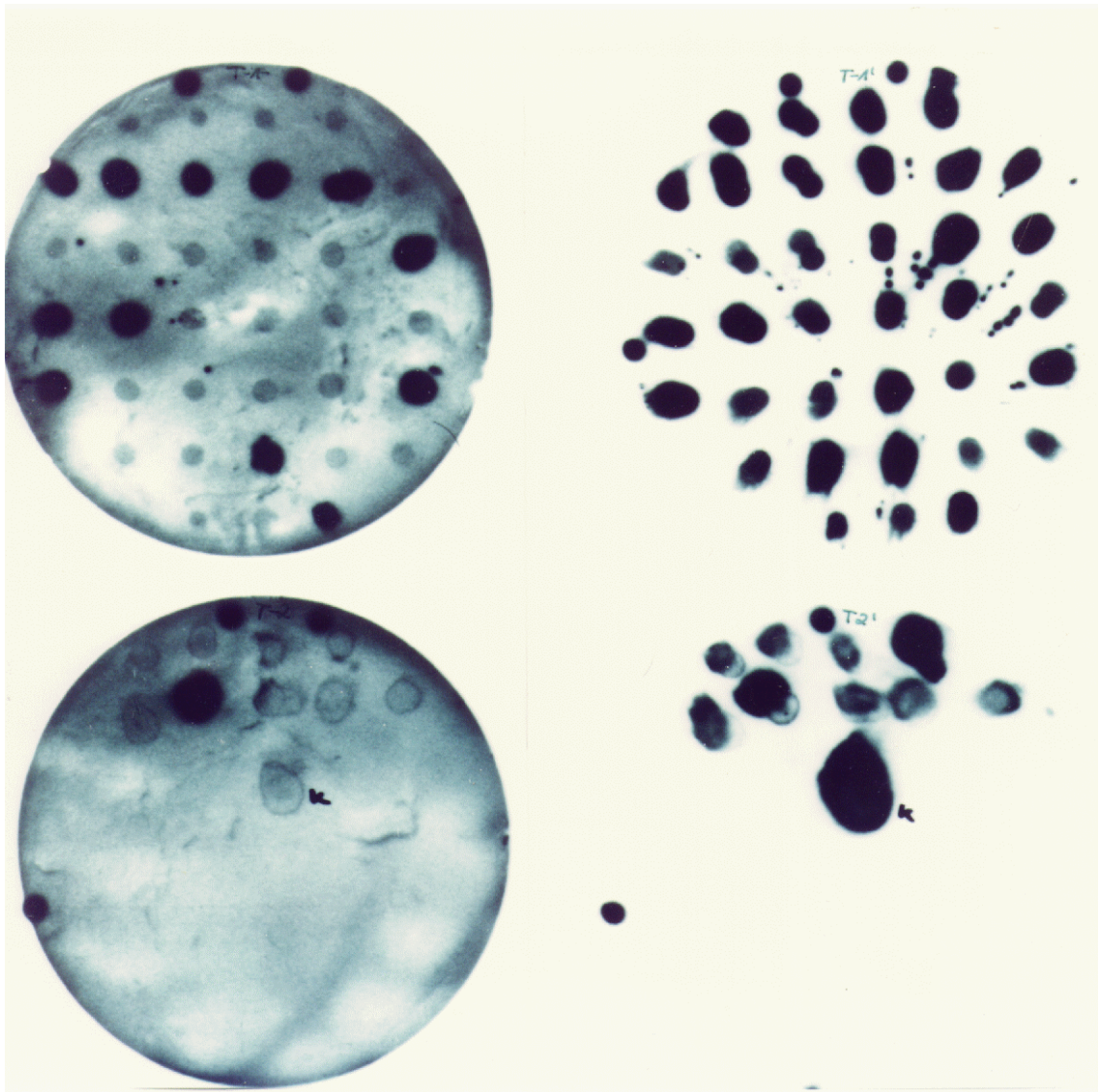


Abbildung 4: Im Phagen Hybridisierungstest (vgl. Material und Methoden 2.2.1.9) wurden die isolierten Einzelklone noch einmal mit ihren Sonden aus dem Screening hybridisiert. Es wurden 44 Einzelklone untersucht. Auf den Filtern sind sowohl Einzelklone aus dem zweiten Screening als auch aus dem dritten Screening aufgetragen. Die Filter auf der linken Seite des Bildes wurden mit dem Oligonukleotid 1338 hybridisiert, die Filter auf der rechten Seite mit dem RFXIII-Fragment aus dem zweiten Screening der Ratten-Makrophagen-cDNA-Bank, Klon 2/4 (vgl. Ergebnisse 3.1.1).

3.1.2 Klonierung:

Die Klonierung aus einer Phagen cDNA-Bank wirft die Schwierigkeit auf, daß in der Phagen-DNA-Präparation das Phagengenom weit überrepräsentiert ist. Man hat nur sehr kleine Insertbanden nach dem Restriktionsverdau aus der cDNA-Bank zu erwarten (Abb.:5). Also sind Gesamt-DNA-Präparationen mit relativ großen DNA-Mengen erforderlich, um eine ausreichende Ausbeute an der gesuchten cDNA zu erzielen. Bei der Klonierung spielte die Orientierung der cDNA im Vektor keine Rolle, da die Klonierung in pKS⁻ nur zur Vermehrung der DNA für weitere Experimente diente. Der im cDNA-Bankscreening gefundene und identifizierte Klon wurde nun in pKS⁻ über Eco R1-Schnittstellen sticky end kloniert (Abb. 6). Nach der Klonierung in den pKS⁻-Vektor stellte sich heraus, daß die RFXIII-cDNA, genau wie die humane cDNA, über eine Eco R1-Schnittstelle verfügt, die bei der Klonierung erhalten geblieben war (Abb.:8), da die Schnittstellen der cDNA in der cDNA-Bank durch Methylierung geschützt sind.

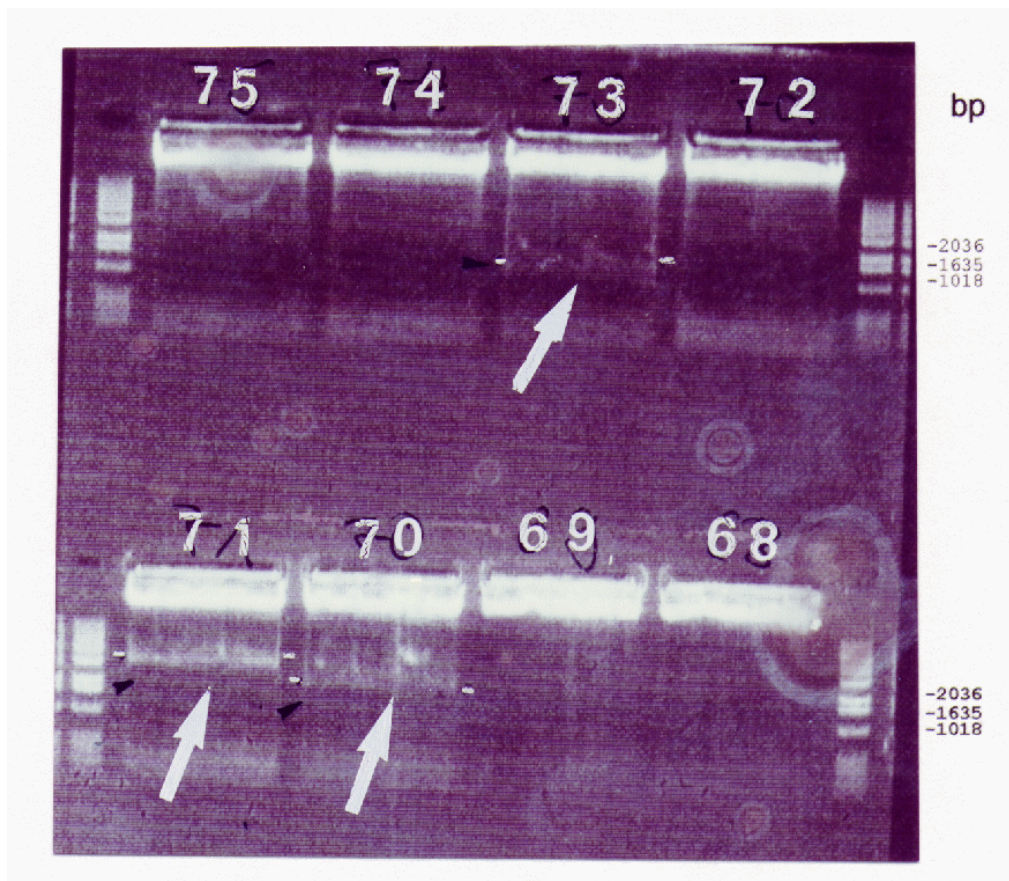


Abbildung 5: Präparativer Eco RI Restriktionsverdau mit anschließender Elektrophorese über ein 1% TAE-Agarosegel von Einzelklonen nach positivem Phagen Hybridisierungstest (vgl. Material und Methoden 2.2.1.9 und Ergebnisse 3.1.1, sowie Abbildung 4). Die Klone mit den Nummern 75,74,72,69,68 ließen mit Eco RI keine Isolation eines cDNA-Fragments zu. Die Fragmente der Klone 70 und 73 sind deutlich kleiner als das zu erwartende cDNA-Fragment, das RFXIII codieren könnte. Klon 71 enthielt die vollständige translatierte Sequenz für RFXIII.

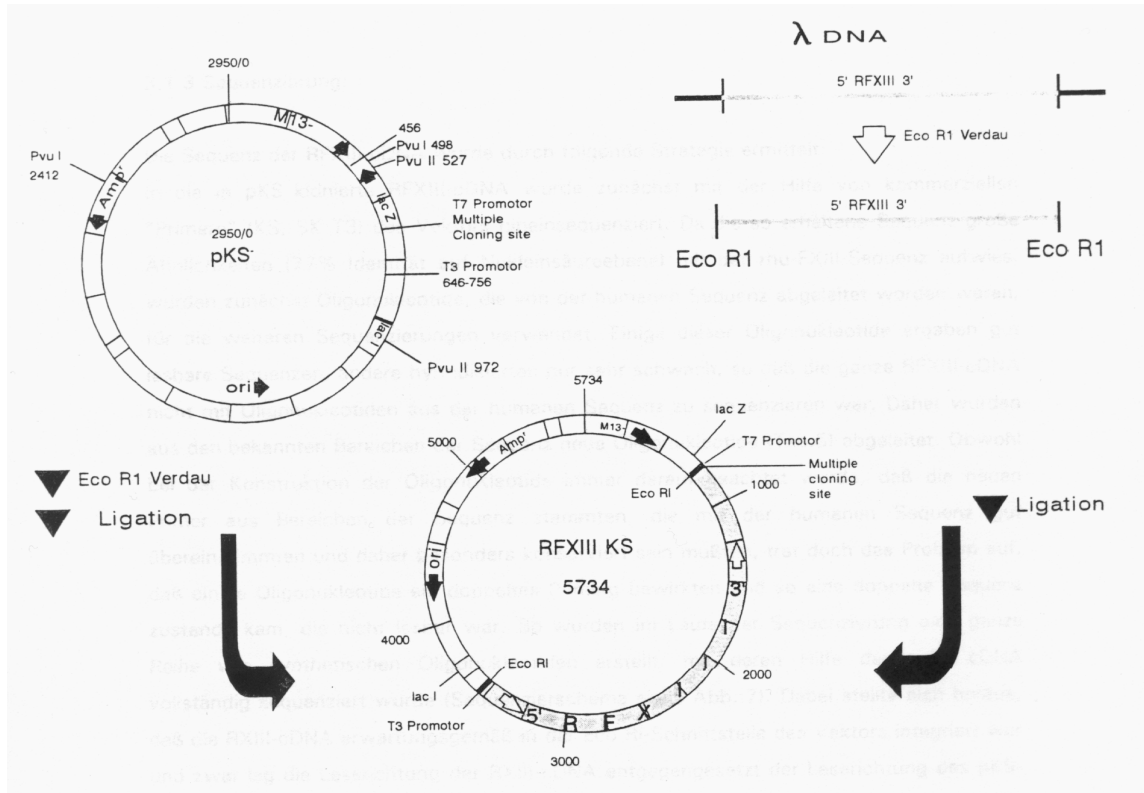


Abbildung 6: Klonierungsschema des RFXIII in pKS. Links oben befindet sich der Ausgangsvektor, rechts oben die Phagen DNA. Der Vektor wurde über eine Eco RI site im Polylinkerbereich linearisiert und das RFXIII cDNA Fragment auch über Eco RI aus der Phagen DNA gewonnen. cDNA und Vektor konnten sticky end miteinander ligiert werden. Das Ergebnis ist das RFXIII-KS Konstrukt unten mitte.

3.1.3 Sequenzierung:

Die Sequenz der RFXIII-cDNA wurde durch folgende Strategie ermittelt:

In die in pKS klonierte RFXIII-cDNA wurde zunächst mit der Hilfe von kommerziellen "Primern" (KS, SK T3) des Vektors hineinsequenziert. Da die so erhaltene Sequenz große Ähnlichkeiten (77% Identität auf Nukleinsäureebene) mit der rhu-FXIII-Sequenz aufwies, wurden zunächst Oligonukleotide, die von der humanen Sequenz abgeleitet worden waren, für die weiteren Sequenzierungen verwendet. Einige dieser Oligonukleotide ergaben gut lesbare Sequenzen, andere hybridisierten nur sehr schwach, so daß die ganze RFXIII-cDNA nicht mit Oligonukleotiden aus der humanen Sequenz zu sequenzieren war. Daher wurden aus den bekannten Bereichen der Sequenz neue Oligonukleotide (Tab.5) abgeleitet. Obwohl bei der Konstruktion der Oligonukleotide immer darauf geachtet wurde, daß die neuen Primer aus Bereichen der Sequenz stammten, die mit der humanen Sequenz gut übereinstimmten und daher besonders konserviert sein mußten, trat doch das Problem auf, daß einige Oligonukleotide ein doppeltes Priming bewirkten und so eine doppelte Sequenz zustande kam, die nicht lesbar war. So wurden im Laufe der Sequenzierung eine ganze Reihe von synthetischen Oligonukleotiden erstellt, mit deren Hilfe dann die cDNA vollständig sequenziert wurde (Sequenzierschema siehe Abb.:7). Dabei stellte sich heraus, daß die RXIII-cDNA erwartungsgemäß in der Eco RI-Schnittstelle des Vektors integriert war und zwar lag die Leserichtung der RXIII-cDNA entgegengesetzt der Leserichtung des pKS-Vektors. Die Sequenz (Abb.:8) ergab eine Länge der cDNA von 2784bp, die einen offenen Leserahmen von 2192bp enthielt und war auf Nukleinsäureebene mit rhu-FXIII zu 82% identisch. Sie codierte für 732 Aminosäuren einschließlich des Initiators Methionin für RFXIII. Der 5' nicht -translatierte Bereich enthielt ein eigenes Startsignal im Leserahmen und war upstream nach dem ersten AUG 39bp lang. Die cDNA enthielt das als optimal für den Translationsstart beschriebene A in Position -3 (Kozak, 1986). Die Nukleotide 1-10 sind teilweise komplementär zu dem 3' Ende der eukaryotischen 18s RNA und könnten eine Ribosomenbindungsstelle repräsentieren:

```

5'  GGUUCUCAGG 3' ...RFXIII mRNA
      |  |  | | |
3'  GAAGGCGUCC 5'..18S RNA

```

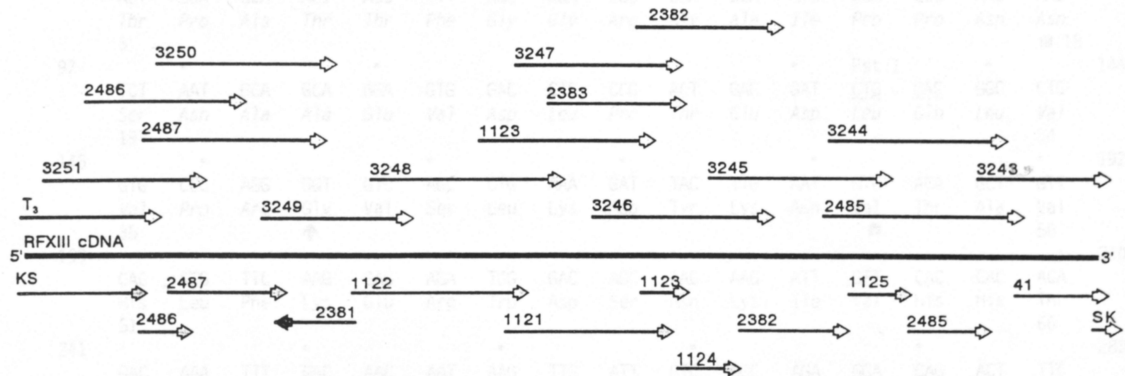
Die 3' flankierende Region hatte ein eigenes Stopcodon (TAA) im Leserahmen und war 549bp lang. Obwohl sich direkt an das Stopcodon ein neues Startsignal anschließt, ist nicht anzunehmen, daß hier die Translation erneut startet, da dieses ATG in einem ungünstigen Kontext liegt (Kozak, 1986). Der 3' flankierenden Region fehlte ein poly-A-Ende, sie besaß dagegen ein Polyadenylierungssignal AATTAA 37 Nukleotide vor der letzten Eco R1

Schnittstelle des Klons. Allerdings ist diese Consensussequenz nicht die einzige: Bereits 232 bp nach dem Stopcodon tritt das erste Mal eine AATTAA-Sequenz auf und bereits 5 bp später folgt dieses Signal ein zweites Mal. 5bp nach der zweiten AATTAA-Sequenz folgt ein CA, ein Signal, das auch bei der Polyadenylierung eine Rolle spielt (Birnstiel et al., 1985). Auch dieses Signal wiederholt sich 5bp später. 111bp später folgt ein drittes AATTAA, dem nach 13bp zwei CAs folgen, die durch 2bp getrennt sind. Direkt anschließend findet man ein GT-Cluster (Birnstiel et al., 1985). Nach weiteren 77bp findet sich das letzte AATTAA. Ihm folgen nach 3bp 3 CAs, die durch jeweils ein bp getrennt sind. Ein GT Cluster fehlt.

Nach der abgeleiteten Aminosäuresequenz (Abb.:8) ist der RFXIII -nach Abspaltung des ersten Methionins- ein Protein von 731 Aminosäuren, das ein theoretisches Molekulargewicht von 82.7kDa hat. Es ist zu rhu-FXIII zu 93% homolog. Vergleicht man die beiden Proteine hinsichtlich ihres Gehaltes an sauren und alkalischen Aminosäuren, so stellt man fest, daß auf eine saure Aminosäure beim Ratten FXIII 0.94 basische Aminosäuren kommen, beim humanen FXIII jedoch 1.01 alkalische Aminosäuren (Tab.6). Demzufolge müßte sich der isoelektrische Punkt der beiden Proteine unterscheiden. Die Proteine unterscheiden sich nicht in ihren Domänen: Thrombinspaltstellen, Ca^{2+} Bindungsstellen und das aktive Zentrum besitzen die identischen Aminosäuren (Abb.:8). Die zwei Proteine stimmen auch in ihren potentiellen Glykolsylierungsstellen überein (Abb.:8). In beiden Aminosäuresequenzen findet man an sechs Stellen das Motiv: Asn-X-Ser, bzw. Asn-X-Thr, das als potentielle Glykolsylierungsstelle gilt (Hubbard, Ivatt, 1981). Auch in diesem Motiv stimmen rhu-FXIII und RFXIII vollkommen überein, es gibt einen Aminosäureaustausch von Alanin bei der Ratte zu Serin beim Menschen an der Position 688. Die potentiellen Glykolsylierungsstellen finden sich an den Positionen 18-20, 47-49, 542-544, 557-559, 614-616, 687-689.

Die in der Nukleinsäuresequenz (Abb.:8) angegebenen Schnittstellen von Restriktionsenzymen wurden für die weiteren Klonierungsschritte genutzt. Die erwarteten Größen der DNA-Fragmente stimmten mit den experimentell ermittelten Fragmentgrößen überein (vgl. Abb.: 8, 12, 15).

Kontrollsequenzierung ABI



Radioaktivsequenzierung S³⁵

Abbildung 7: Sequenzierschema für die Sequenzierung der RFXIII cDNA. Oberhalb der cDNA sind die Kontrollsequenzierungen mit dem Sequenzierautomaten der Firma Applied Biosystems wiedergegeben. Unterhalb der cDNA sind die radioaktiv Sequenzierungen nach Sanger mit S³⁵ dargestellt. Die Nummern an den Pfeilen geben die Nummern der verwendeten Oligonukleotide an. Die Orientierung der Pfeile die Richtung der Sequenzierung. Die Basensequenz der Oligonukleotide, die sich von der humanen FXIII cDNA ableiten sind in Material und Methoden unter 2.2.3, Tabelle 3 aufgeführt. Die Oligonukleotide, die sich von der Rattensequenz herleiten sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 5: Liste der von der Rattensequenz abgeleiteten Oligonukleotiden

| Nr. | Position auf der RXIII-cDNA | Basensequenz von 5'- 3' | Verwendung |
|------|-----------------------------|-------------------------|---------------|
| 3251 | +1-+22 | GGTTCTCAGGAGCACAAGCAGG | Sequenzierung |
| 2487 | +262-+279 | CAGAGGACAGACTTTCT | Sequenzierung |
| 3250 | +301-+322 | GACTTCAATCGCCCATATGACC | Sequenzierung |
| 3249 | +601-+622 | TGGTGCGAAGAAGACGCTGTGT | Sequenzierung |
| 2486 | +681-+664 | AAATATCACTCCGATGTCT | Sequenzierung |
| 3248 | +902-+922 | TCCCTTCCATCAGCCTGGACAG | Sequenzierung |
| 3247 | +1201-+1222 | GTTGGATTTGGAGGCTGGCAAG | Sequenzierung |
| 3246 | +1501-+1522 | CAAGAAGAAGAGAGACTAGCCC | Sequenzierung |
| 3245 | +1804-+1825 | CTGATCAGAGCAGGCGAGTATA | Sequenzierung |
| 2485 | +2024-+2038 | AAAATGTCTGGCTTC | Sequenzierung |
| 3244 | +2107-+2138 | GTGCAGTGGAAGAAGTCTGTC | Sequenzierung |
| 3243 | +2531-+2551 | TGGCTACAGCTCCACAGATCAG | Sequenzierung |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|-----------------|-----------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|------------------------|------------------|------------|-----|
| 1 | GGTTCTCAGGAGCACAAGCAGGATCCAGTAAAGCTGAAA | | | | | | | | | | | | | | | ATG Met -1 | TCG Ser +1 | GAT Asp | 48 |
| 49 | • ACT Thr 3 | • CCA Pro | • GCA Ala | • ACT Thr | • ACC Thr | • TTT Phe | • GGG Gly | • GGA Gly | • CGG Arg | • GGA Gly | • GCA Ala | • ATC Ile | • CCA Pro | • CCC Pro | • AAC Asn | • AAC Asn | • | • | 96 |
| 97 | • TCT Ser 19 | • AAT Asn | • GCA Ala | • GCA Ala | • GGA Glu | • GTG Val | • GAC Asp | • CTC Leu | • CCG Pro | • ACT Thr | • GAG Glu | • GAT Asp | Pst 1 • CTG Leu | • CAG Gln | • GGC Leu | • CTG Val 34 | • | • | 144 |
| 145 | • GTG Val 35 | • CCC Pro | • AGG Arg | • GGT Gly ↑ | • GTC Val | • AGC Ser | • CTG Leu | • AAA Lys | • GAT Asp | • TAC Tyr | • TTG Lys | • AAT Asn | • GTC Val ■ | • ACA Thr | • GCT Ala | • GTT Val 50 | • | • | 192 |
| 193 | • CAC His 51 | • CTG Leu | • TTC Phe | • AAG Lys | • GAG Glu | • AGA Arg | • TGG Trp | • GAC Asp | • AGC Ser | • AAC Asn | • AAG Lys | • ATT Ile | • GTT Val | • CAC His | • CAC His | • ACA Thr 66 | • | • | 240 |
| 241 | • GAC Asp 67 | • AAA Lys | • TTT Phe | • GAC Asp | • AAC Asn | • AAT Asn | • AAG Lys | • TTG Leu | • ATT Ile | • GTC Val | • CGC Arg | • AGA Arg | • GGA Gly | • CAG Gln | • ACT Thr | • TTC Phe 82 | • | • | 288 |
| 289 | • TAC Tyr 83 | • ATC Ile | • CAG Gln | • ATT Ile | • GAC Asp | • TTC Phe | • AAT Asn | • CGC Arg | • CCA Pro | • TAT Tyr | • GAC Asp | • CCC Pro | • AGG Arg | • AAG Lys | • GAT Asp | • CTC Leu 98 | • | • | 336 |
| 337 | • TTC Phe 99 | • AGA Arg | • GTG Val | • GAA Glu | • TAT Tyr | • GTC Val | • ATT Ile | • GGT Gly | • CGC Arg | • TAC Tyr | • CCT Pro | • CAG Gln | • GAG Glu | • AAT Asn | • AAG Lys | • GGC Gly 114 | • | • | 384 |
| 385 | • ACC Thr 115 | • TAC Tyr | • ATC Ile | • CCA Pro | • GTG Val | • CCG Pro | • GTA Val | • GTG Val | • ACG Thr | • GAG Glu | • CTC Leu | • CAA Gln | • AGC Ser | • GGA Gly | • AAG Lys | • TGG Trp 130 | • | • | 432 |
| 433 | • GGG Gly 121 | • GCC Ala | • AAG Lys | • GTT Val | • ATC Ile | • ATG Met | • AAT Asn | • GAG Glu | • GAC Asp | • AGG Arg | • TCT Ser | • GTG Val | • CGG Arg | • CTT Lys | • TCC Ser | • GTT Val 146 | • | • | 480 |
| 481 | • CAG Gln 147 | • TCT Ser | • TCC Ser | • CCC Pro | • GAA Glu | • TGC Cys | • ATC Ile | • GTG Val | • GGG Gly | • AAA Lys | • TTC Phe | • CGC Arg | • ATG Met | • TAT Tyr | • GTT Val | • GCC Ala 162 | • | • | 528 |
| 529 | • GTC Val 163 | • TGG Trp | • ACT Thr | • CCC Pro | • TAT Tyr | • GGC Gly | • ATC Ile | • CTG Leu | • CGT Arg | • ACT Thr | • CAG Gln | • AGA Arg | • GAC Asp | • CCG Pro | • GAA Glu | • ACA Thr 178 | • | • | 576 |
| 577 | • GAC Asp 179 | • ACA Thr | • TAC Tyr | • ATT Ile | • CTC Leu | • TTC Phe | • AAT Asn | • CCT Pro | • TGG Trp | • TGC Cys | • GAA Glu | • GAA Glu | • GAC Asp | • GCT Ala | • GTG Val | • TAT Tyr 194 | • | • | 624 |
| 625 | • CTG Leu 195 | • GAT Asp | • GAT Asp | • GAG Glu | • AAA Lys | • GAA Glu | • AGA Arg | • GAA Glu | • GAG Glu | • TAC Tyr | • GTC Val | • CTA Leu | • AAT Asn | • GAC Asp | • ATC Ile | • GGA Gly 210 | • | • | 672 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------|---|-----------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|------|
| 673 | GGT Val 211 | ATA Ile | • TTT Phe | CAT His | GGG Gly | • GAC Asp | TTC Phe | AAT Asn | GAC Asp | • ATC Ile | AAG Lys | AGC Ser | • AGA Arg | AGC Ser | TGG Trp | • AGC Ser 226 | 720 |
| 721 | TAT Tyr 227 | GGC Gly | CAG Gln | • TTT Phe | GAA Glu | GAT Asp | • GGC Gly | ATC Ile | CTG Leu | • GAC Asp | GCT Ala | TGC Cys | TTG Cys | • TTT Phe | GTG Val | ATG Met 242 | 768 |
| 769 | • GAC Asp 243 | AAA Lys | GCT Ala | • GAG Glu | ATG Met | GAC Asp | CTT Leu | • TCT Ser | GGC <u>Gly</u> Ca²⁺ | AGA Arg | GGG Gly | AAC Asn | CCC Pro | • ATC Ile | AAA Lys | GTC Val 258 | 816 |
| 817 | AGC Ser 259 | • CGA Arg | GTT Val | GGA Gly | • TCA Ser | GCA Ala | ATG Met | GTG Val | AAT Asn | GCC Ala | AAG Lys | GAT Asp | GAC Asp | GAA Glu | • GGT Gly | GTG Val 274 | 864 |
| 865 | CTG Leu 275 | • GTT Val | GGA Gly | TCA Ser | TGG Trp | • GAC Asp | AAT Asn | GTC Val | TAT Tyr | GCC Ala | TAC Tyr | • GGA Gly | ATC Ile | CCT Pro | CCA Pro | • TCA Ser 290 | 912 |
| 913 | GCC Ala 291 | TGG Trp | • ACA Thr | GGA Gly | AGT Ser | • GTT Val | GAC Asp | ATT Ile | CTA Leu | • CTA Leu | GAA Glu | TAC Tyr | • AGA Arg | AGC Ser | TCA Ser | • GAA Glu 306 | 960 |
| 961 | ACA Thr 307 | CCA Pro | GTC Val | • CGA Arg | TAT <u>Tyr</u> | • GGC <u>Gly</u> | • CAG <u>Gln</u> | TGC <u>Cys</u> | TGG <u>Trp</u> | • GTT Val | TTG Leu | GCT Ala | GGT Gly | • GTC Val | TTT Phe | AAC Asn 322 | 1008 |
| 1009 | • ACA Thr 323 | TTT Phe | TTA Leu | • AGG Arg | TGC Cys | CTT Leu | GGA Gly | ATC Ile | CCT Pro | GCG Ala | AGA Arg | GTC Val | ATT Ile | ACC Thr | AAT Asn | TAC Tyr 338 | 1056 |
| 1057 | TCT Phe 339 | • TCA Ser | GCC Ala | CAC His | GAC Asp | AAT Asn | GAT Asp | GCC Ala | AAT Asn | TTG Leu | CAA Gln | ATG Met | GAC Asp | ATC Ile | TTC Phe | CTG Leu 354 | 1104 |
| 1105 | GAA Glu 355 | • GAA Glu | GAT Asp | GGG Gly | AGT Ser | • GTG Val | AGC Ser | TTC Ser | AAA Lys | • CTC Leu | ACC Thr | AAG Lys | GAT Asp | TCA Ser | GTG Val | • TGG Trp 370 | 1152 |
| 1153 | AAC Val 371 | TAC Gly | • CAC Phe | TGC Gly | TGG Gly | AAT Trp | GAA Gln | GCA Ala | TGG Val | • ATG Asp | ACG Ser | AGG Thr | CCT Pro | GAT Gln | CTC Glu | CCT Asn 386 | 1200 |
| 1201 | GTT Ser 387 | GGA Asp | TTT Gly | • GGA Met | GGC Tyr | TGG Arg | CAA Cys | GCT Gly | GTG Pro | GAC Ala | AGC Ser | ACA Val | CCC Gln | • CAA Ala | GAA Val | AAC Lys 402 | 1248 |
| 1249 | • AGC His 403 | GAT Gly | GGC His | • ATG Val | TAC Cys | CGC Phe | TGT Gln | GGC Phe | CCT Asp | GCC Ala | TCT Pro | GTT Phe | CAA Val | • GCC Leu | GTT Ala | AAG Glu 418 | 1296 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|------------------------|------|
| 1297 | CAC Val 419 | • GGC Asn | CAT Ser | GTC Asp | • TGC Leu | TTC Val | CAG Tyr | • TTT Ile | GAT Thr | GCC Ala | CCA Lys | • TTT Lys | GTT Asp | TTG Gly | • GGA Thr | GAG His 434 | 1344 |
| 1345 | GTC Val 435 | • AAC Asn | AGT Ser | GAT Asp | • CTT Leu | GTT Val | TAC Tyr | • ATC Ile | ACA Thr | GCT Ala | AAG Lys | • AAA Lys | GAT Asp | GGC Gly | ACC Thr | • CAC His 450 | 1392 |
| 1393 | GTG Val 451 | GTA Val | • GAG Glu | AAC Asn | GTG Val | • GAT Asp | GCC Ala | ACC Thr | CAC His | • ATC Ile | GGG Gly | AAG Lys | • CTA Leu | ATT Ile | GTG Val | • ACC Thr 466 | 1440 |
| 1441 | | | • | | | | • | | | • Eco RV GAT Asp | ATC Ile | ACG Thr | GAT Asp | ACT Thr | TAC Tyr | AAA Lys 482 | 1488 |
| 1489 | • TTT Phe 483 | CAG Gln | GAA Glu | • GGC Gly | CAA Gln | GAA Glu | GAA Glu | • GAG Glu | AGA Arg | CTA Leu | • GCC Ala | CTT Leu | GAA Glu | • ACT Thr | GCC Ala | CTG Leu 498 | 1536 |
| 1537 | ATG Met 499 | • TAT Tyr | GGA Gly | GCC Ala | • AAG Lys | AAG Lys | ACC Thr | • CTC Leu | AAT Asn | ACT Thr | GAA Glu | • GGC Gly | ATG Met | GTC Val | • AAA Lys | TCC Ser 514 | 1584 |
| 1585 | AGT Ser 515 | • TCT Ser | GAT Asp | GTG Val | • GAC Asp | ATG Met | AAC Asn | TTT Phe | • GAT Asp | GTG Val | GAA Glu | • AAT Asn | GCT Ala | GTG Val | CTG Leu | • GGA Gly 530 | 1632 |
| 1633 | AAA Lys 531 | GAC Asp | • TTC Phe | AGA Arg | GTG Val | • ACT Thr | ATC Ile | ACC Thr | TTC Phe | • CAG Gln | AAC Asn | AAT Asn ■ | • AGC Ser | TCC Ser | AAT Asn | • CTG Leu 546 | 1680 |
| 1681 | TAC Tyr 547 | ACC Thr | ATC Ile | • CTG Leu | GCC Ala | TAT Tyr | • CTT Leu | TCC Ser | GGC Gly | • AAC Asn | ATC Ile ■ | ACC Thr | TTC Phe | • TAC Tyr | ACT Thr | GGG Gly 562 | 1728 |
| 1729 | • GTA Val 563 | TCC Ser | AAG Lys | • AAA Lys | GAG Glu | TTC Phe | AAG Lys | • ACA Thr | GAG Glu | TCC Ser | • TTT Phe | GAA Glu | GTG Val | • ACG Thr | CTG Leu | GAT Asp 578 | 1776 |
| 1777 | CCC Pro 579 | • TTG Leu | TCC Ser | TTA Leu | • GAG Glu | AAA Lys | AAG Lys | • GAG Glu | GTG Val | CTG Leu | ATC Ile | • AGA Arg | GCA Ala | GGC Gly | • GAG Glu | TAT Tyr 594 | 1824 |
| 1825 | ATG Met 595 | • AGC Ser | TAC Tyr | CTT Leu | CTG Leu | • GAA Glu | CAG Gln | GGC Glu | • CTC Leu | CTG Leu | CAC His | • TTC Phe | TTC Phe | GTC Val | ACT Thr | • GCA Ala 610 | 1872 |
| 1873 | CGC Arg 611 | ATC Ile | • AAC Asn | GAG Glu ■ | ACC Thr | • AGG Arg | GTC Val | GTC Val | CTG Leu | • GCC Ala | AAG Lys | CAG Gln | • AAG Lys | GCC Ser | ATA Ile | GTG Val 626 | 1920 |
| 1921 | CTG Leu 627 | ACT Thr | ATC Ile | • CCC Pro | AAG Lys | GTC Val | • ACC Thr | ATC Ile | AAG Lys | • GTC Val | CGA Arg | GGC Gly | | • Nco I GCC Ala | ATG Met | GTT Val 642 | 1968 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|---------|------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----|------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 1969 | • | GGC | TCT | GAT | ATG | GTT | GTG | ACT | GTT | GAG | TTC | ACA | AAT | CCT | TTG | AAA | GAA | 2016 |
| | | Gly | Ser | Asp | Met | Val | Val | Thr | Val | Glu | Phe | Thr | Asn | Pro | Leu | Lys | Glu | |
| | | 643 | | | | | | | | | | | | | | | 658 | |
| 217 | • | ACG | CTA | AAA | AAT | GTC | TGG | CTT | CAC | TTG | GAA | GGT | CCT | GGA | GTG | ATG | AGA | 2064 |
| | | Thr | Leu | Lys | Asn | Val | Trp | Leu | His | Leu | Glu | Gly | Pro | Gly | Val | Met | Arg | |
| | | 659 | | | | | | | | | | | | | | | 674 | |
| 2065 | • | CCC | AAG | AGG | AAG | ATG | TTC | CGT | GAA | ATC | CGG | CCC | AAC | GCC | ACT | GTG | CAG | 2112 |
| | | Pro | Lys | Arg | Lys | Met | Phe | Arg | Glu | Ile | Arg | Pro | Asn | Ala | Thr | Val | Gln | |
| | | 675 | | | | | | | | | | | | ■ | | | 690 | |
| 2113 | • | TGG | GAA | GAA | GTC | TGT | CAG | CCT | TGG | GTC | TCT | GGT | CAT | CGG | AAG | CTG | AAT | 2160 |
| | | Trp | Glu | Glu | Val | Cys | Gln | Pro | Trp | Val | Ser | Gly | His | Arg | Lys | Leu | Ile | |
| | | 691 | | | | | | | | | | | | | | | 706 | |
| 2161 | • | GCC | AGC | ATG | ACC | AGT | GAC | TCC | CTG | AGA | CAT | GTG | TAT | GGA | GAG | CTG | GAC | 2208 |
| | | Ala | Ser | Met | Thr | Ser | Asp | Ser | Leu | Arg | His | Val | Tyr | Gly | Glu | Leu | Asp | |
| | | 707 | | | | | | | | | | | | | | | 722 | |
| 2209 | • Pst I | | | • | | | | • | | | | • | | • | | | | 2260 |
| | | <u>CTG</u> | <u>CAG</u> | ATT | CGA | AGA | CGA | CCT | ACT | GTA | TAA | | | | | | | |
| | | Leu | Gln | Ile | Arg | Arg | Arg | Pro | Thr | Val | Stop | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | 731 | | | | | | | | |
| 2261 | | | | | | | | | | | | Nhe I | | | | | | 2340 |
| | • | CTGGGGCAC | TGGCCTATT | CAGTCTTGG | TATGGCCAT | CTAACGCAA | ACATAGCTA | CTCTTGCTT | AATTTGGGT | | | | | | | | | |
| | A | | G | T | T | A | G | T | G | | | | | | | | | |
| 2341 | • | TGAAGACTA | GACAGATTC | AGCATAGAG | TGCTATGTA | TTCATAGAC | CGCCTTTCC | AACAGGCTA | TGGACAAGG | | | | | | | | | 2420 |
| | A | | C | A | T | A | A | T | G | | | | | | | | | |
| 2421 | • | GAGTTAGAT | TGAGTTGTT | CACCTCCAA | GGGTCTGAG | ATTAGCTTA | TTAAGCTAT | ATTAAGCCT | CATAGCTCA | | | | | | | | | 2500 |
| | T | | C | A | C | A | A | T | T | | | | | | | | | |
| 2501 | • | AAGATGAAA | CCATCATTT | TCACTGCAA | TGGGTACAG | TCACAGATC | GAGGTCTTG | CCATGAGCA | GGGGGATGT | | | | | | | | | 2580 |
| | G | | A | A | C | A | C | G | G | | | | | | | | | |
| 2581 | • | | | Eco RI | | | | | | | | | | | | | | 2660 |
| | • | CCCAATACC | GGCCTCAAT | AAGAATTCT | ATTCCCACT | AGTCTTTTA | GGGTAACAT | CTCCCCAAA | GAAAGGGTG | | | | | | | | | |
| | T | | T | G | C | G | A | G | T | | | | | | | | | |
| 2661 | • | CCACAATCA | ATCCTAAAA | TTCTATTCC | CTTTCTTGG | ATCAGGTTG | ACCCTCCGT | TTAAAATAT | TTTTTCCAG | | | | | | | | | 2740 |
| | G | | A | C | A | A | A | T | G | | | | | | | | | |
| 2741 | • | <u>AATTAAGCC</u> | AACATCATT | TTCTTCCTG | CAAAGCCTT | CTCT | | | | | | | | | | | | 2784 |
| | C | | T | G | T | | | | | | | | | | | | | |

Abbildung 8: cDNA Sequenz mit abgeleiteter Aminosäuresequenz des RFXIII.

Oberhalb der cDNA sind mit • alle 10 Basen markiert. Die Nummern am Rand beziehen sich auf die cDNA, die Nummern unter den Aminosäuren zeigen die Positionen in der Aminosäuresequenz an.

In der cDNA Sequenz wurden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen hervorgehoben, die während der Klonierungen verwendet wurden. Die mögliche Ribosomenbindungsstelle ist **fett** hervorgehoben, das Polyadenylierungssignal wurde unterstrichen.

In der Aminosäuresequenz wurde das Aktivierungspeptid kursiv dargestellt, Ca²⁺ Bindungsstellen und das aktive Zentrum durch Unterstreichen hervorgehoben. Mögliche Glykolisierungsstellen wurden

durch ■ gekennzeichnet und die Thrombinspaltstellen durch Pfeile ↑ hervorgehoben.

Tabelle 6: Aminosäurezusammensetzung von RFXIII nach der abgeleiteten Aminosäuresequenz

(Basische Aminosäuren sind fett und kursiv hervorgehoben, saure Aminosäuren sind fett hervorgehoben.)

| Aminosäure | Anzahl der Seitengruppen | |
|-----------------------|--------------------------|--|
| | RFXIII | hum FXIII (Takahashi et al., 1986, Ichinose et al., 1986) |
| Alanin | 37 | 37 |
| Arginin | 39 | 45 |
| Asparagin | 36 | 40 |
| Asparaginsäure | 50 | 47 |
| Cystein | 9 | 9 |
| Glutamin | 23 | 26/27 |
| Glutaminsäure | 49 | 49/48 |
| Glycin | 52 | 50 |
| Histidin | 14 | 14 |
| Isoleucin | 37 | 38/39 |
| Leucin | 56 | 48 |
| Lysin | 40 | 38 |
| Methionin | 19 | 18/19 |
| Phenylalanin | 31 | 32 |
| Prolin | 33 | 33 |
| Serin | 44 | 46/45+1 acetyl-Serin |
| Threonin | 47 | 45 |
| Tryptophan | 15 | 15 |
| Tyrosin | 28 | 29 |
| Valin | 72 | 71/70 |
| Summe | 731 | 730/731 |

Die Literaturangaben zu der Aminosäurezusammensetzung von rhu-FXIII weisen leichte Unterschiede auf. In der Tabelle werden die Zahlen, die auf Takahashi et al zurückgehen an erster Stelle genannt, an zweiter Stelle folgen die Werte -soweit abweichend- von Ichinose et al.

3.2 Hefeexpression:

3.2.1 Klonierung in die Expressionsplasmide

Die RFXIII cDNA wurde in Hefe exprimiert, da neben theoretischen Überlegungen, die für dieses Expressionssystem sprachen (vgl. 4. Diskussion), mit der humanen FXIII cDNA schon gute Erfahrungen mit diesem Expressionssystem vorlagen (Bröker et al. 1990). Für die Expression in Hefe wurde ein Stamm gewählt, der an Proteasen defizient war, um die Stabilität des rekombinanten Proteins während der Fermentation zu verbessern und gleichzeitig Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung des Hefelysates während der Proteinreinigung zu vermeiden. Der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* CL3ABYS86 ist defizient an vier Proteasen (pra1, prb1, prc1, cps1) und lässt sich auch schon in der Schüttelkultur zu hohen Organismendichten (1×10^8 Zellen pro ml Kultur) anziehen. Während aller Expressionsexperimente wurde mit diesem Stamm gearbeitet. Variiert wurden lediglich die Länge der cDNA und die Promotoren (s.u.). Es wurden verschiedene RFXIII-Konstrukte hergestellt (Abb.:9, 10, 12, 13). Bei der Konstruktion wurden zwei Wege beschritten: Erstens wurden mit den Konstrukten zwei unterschiedliche Promotoren GAL/CYC, (Abb.:9+10), ADH2, (Abb.:12+13) getestet, zweitens wurden von die RFXIII-cDNA sowohl in ihrer ursprünglichen Länge (Abb.:9, 12), als auch in einer 3' verkürzten Version (Abb.:10, 13) verwendet, da eine 3' Verkürzung um 302 bp im Fall des rhu-FXIII eine Erhöhung des Expressionslevels um etwa das 100-fache zur Folge hatte (Bröker et al., 1991). Die verkürzte Version ließ sich durch eine Nhe I-Schnittstelle in der RXIII-cDNA herstellen, die 86 Basenpaare hinter dem Stopcodon lag. Die cDNA wurde so am 3' nichttranslatierten Ende um 468 bp verkürzt. Die Ausgangsvektoren für die Klonierungen waren pEMBLyex4 und pMB 354. Zur Übersicht über die verwendeten Vektoren siehe Tabelle 7.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Konstrukte:

| Konstrukt | Größe [bp] | Selektions-system | Cloning Site | Promotor |
|----------------------|------------|---------------------------------|-----------------|-----------|
| RFXIII KS | 5734 | Amp ^r | Eco R1 | |
| pEMBLyex4 RFXIII | 11584 | Amp ^r , LEU 2, URA 3 | Hind III, Xba I | Gal/Cyc I |
| pEMBLyex RFXIII verk | 11116 | Amp ^r , LEU 2, URA 3 | Bam HI, Nhe I | Gal/Cyc I |
| pMB354 RFXIII | 9934 | Amp ^r , URA 3 | Bam HI | ADH II |
| pMB354 RFXIII verk | 9466 | Amp ^r , URA 3 | Bam HI | ADH II |

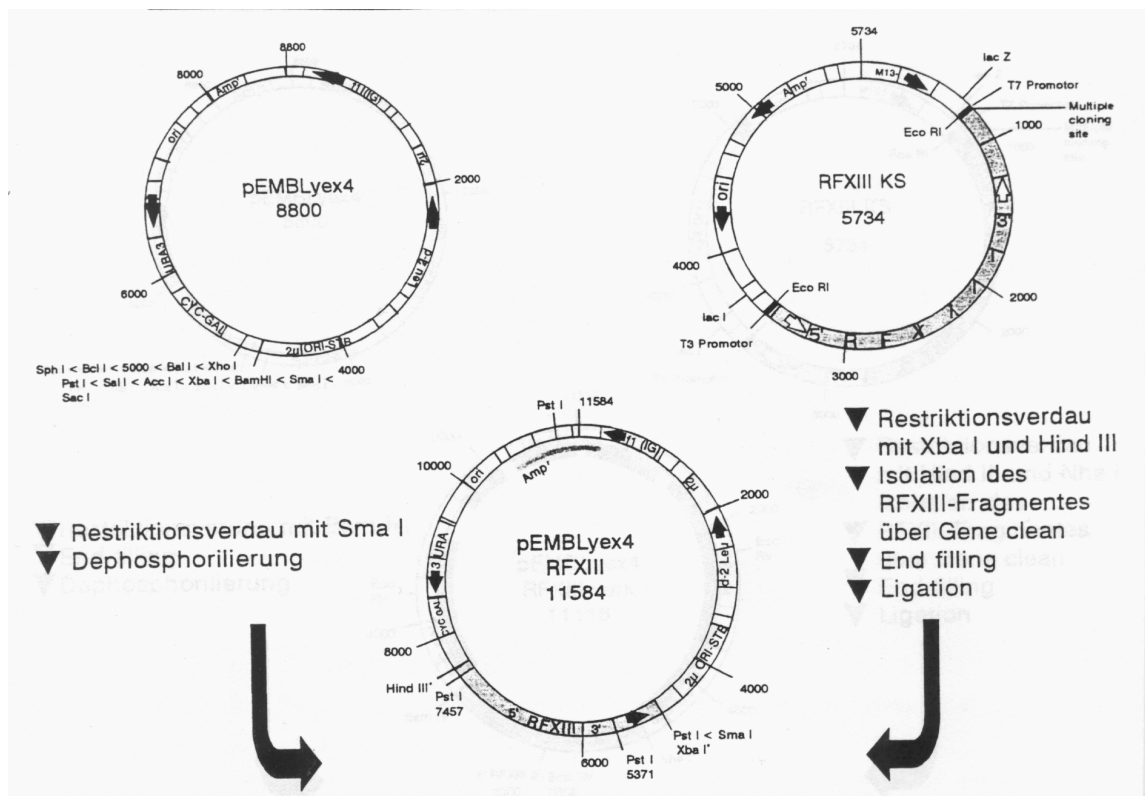


Abbildung 9: Klonierungsschema von RFXIII in den Expressionsvektor pEMBLyex4.

Zur Expression in *Saccharomyces cerevisiae* CL3ABYS86 mußte RFXIII in einen Expressionsvektor kloniert werden. Dieser Vektor (oben links) wurde mit Sma I geschnitten und dephosphoriert. Die RFXIII cDNA wurde über einen Xba I/ Hind III Restriktionsverdau aus dem RFXIII KS Konstrukt gewonnen (oben rechts). Nach einem end filling wurde die cDNA blunt end in den Expressionsvektor kloniert.

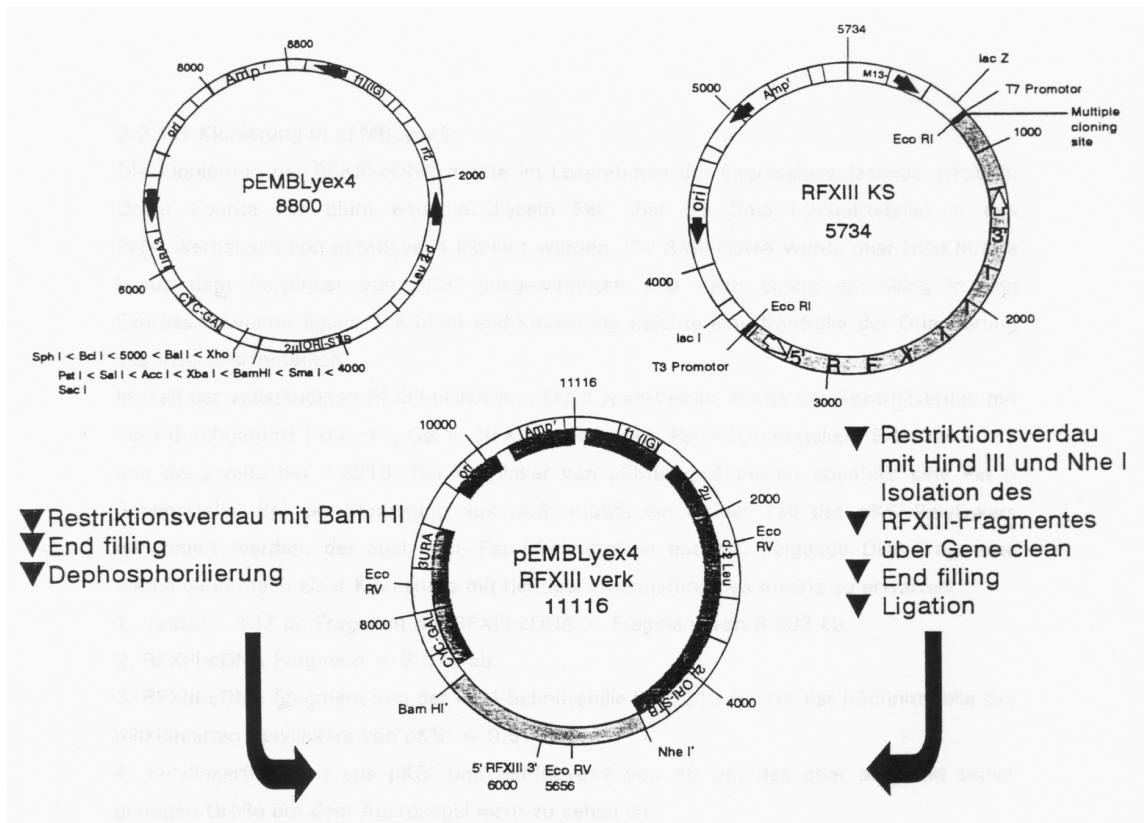


Abbildung 10: Klonierungsschema der 3' verkürzten RFXIII cDNA in den Expressionsvektor pEMBLyex4. Der Expressionsvektor (oben links) wurde mit Bam HI geschnitten. Ein anschließendes end filling und eine Dephosphorilierung ergaben die gewünschten Ausgangsbedingungen für die Klonierung. Die RFXIII cDNA wurde mit einem Hind III/NheI Restriktionsverdau aus dem RFXIII KS Konstrukt (oben rechts) erhalten und so gleichzeitig am 3' Ende verkürzt. Nach einem end filling des Inserts konnte es in den vorbereiteten Vektor ligiert werden.

3.2.1.1 Klonierung in pEMBLyex4:

Die Klonierung der RFXIII-cDNA mußte im Leserahmen der Expressionsplasmide erfolgen. Daher konnte nur blunt end (in diesem Fall über die Sma I-Schnittstelle) in den Polylinkerbereich von pEMBLyex4 kloniert werden. Die RFXIII-cDNA wurde über Hind III/Xba I aus dem Polylinker von pKS⁻ ausgeschnitten und nach einem end-filling in den Expressionsvektor ligiert. Die blunt end-Klonierung machte eine Kontrolle der Orientierung des Inserts erforderlich.

Im Fall der vollständigen RFXIII-cDNA im pEMBLyex4-Vektor wurde der Kontrollverdau mit Pst I durchgeführt (Abb.:11, Gel I). RFXIII besitzt zwei Pst I-Schnittstellen: Eine bei +137 und die zweite bei +2213. Der Polylinker von pEMBLyex4 besitzt ebenfalls eine Pst I-Schnittstelle. Bei der Klonierung aus pKS⁻ mußte ein kleiner Teil des pKS⁻-Polylinkers mitkloniert werden, der auch eine Pst I-Schnittstelle enthielt. Folgende DNA-Fragmente waren daher nach einer Klonierung mit richtiger Orientierung des Inserts zu erwarten:

1. Vektor+ 137 bp Fragment der RFXIII-cDNA = Fragment von 8.937 kb
2. RFXIII-cDNA Fragment = 2.076 kb
3. RFXIII-cDNA Fragment von der Pst I-Schnittstelle bei 2213 bis zur Pst I-Schnittstelle des mitklonierten Polylinkers von pKS⁻ = 0.578 kb
4. Polylinkerfragment aus pKS⁻ und pEMBLyex4 von 46 bp, das aber aufgrund seiner geringen Größe auf dem Agarosegel nicht zu sehen ist.

Im Fall der falschen Orientierung der RFXIII-cDNA müßten nach einem Pst I-Verdau folgende DNA-Fragmente zu beobachten sein:

1. Vektorbande von 8.8 kb
2. RFXIII Fragment von 2.076 kb
3. RFXIII Fragment und ein Stück des mitklonierten pKS⁻-Polylinkers von 0.578 kb
4. RFXIII Fragment von der Schnittstelle bei +137 bis zur Pst I-Schnittstelle des pEMBLyex4 Polylinkers von 0.162kb. Bei der Suche nach den richtig orientierten Klonen ist also auf das Auftreten des 0.162kb Fragmentes zu achten, das die Klone mit der falschen Orientierung des Inserts charakterisiert. In der Abbildung sind diese Fragmente durch Pfeile gekennzeichnet.

Auch die verkürzte cDNA mußte blunt end in pEMBLyex 4 kloniert werden, um im Leserahmen des Vektors zu bleiben. Die RXIII-cDNA wurde Hind III/Nhe I aus dem pKS⁻-Vektor ausgeschnitten und dabei um 468 bp verkürzt. Durch ein end-filling konnte das Insert in den Bam H I geschnittenen und ebenfalls durch ein end-filling blunt end gemachten Vektor kloniert werden. Dadurch mußte wieder die Orientierung des Inserts durch einen Restriktionsverdau bestimmt werden. Hier bot sich Eco RV an (Abb.:10+11, Gel II), welches in pEMBL zwei Schnittstellen hat und in der cDNA eine bei Position +1470 sowie eine weitere Schnittstelle im mitklonierten Polylinkerbereich aus pKS⁻. Bei richtiger Orientierung des Inserts sind also folgende DNA-Fragmente zu erwarten:

1. Eine Vektorbande von 5.1 kb
2. Eine weitere Vektorbande von 2.4 kb+ 0.746 kb RXIII-cDNA = 3.2 kb
3. Ein RXIII-cDNA Fragment mit dem mitklonierten pKS- Polylinker = 1.480 kb
4. Ein weiteres Vektorfragment von 1.3 kb.

Im Fall der falschen Orientierung sind folgende Fragmente zu erwarten (siehe Abb.:11, Gel II):

1. Eine Vektorbande von 5.1 kb.
2. Eine weitere Vektorbande von 2.4 kb
3. Eine Vektorbande von 1.3 kb+ 0.746 kb Fragment aus der RXIII-cDNA = 2.046 kb
4. Ein Fragment RXIII-cDNA von 1.48 kb.

Die Klone mit der falschen Orientierung des Inserts unterscheiden sich also durch das Auftreten von zwei nah beieinander liegenden Banden im oberen Bereich des Agarosegels (2.4kb und 2.046kb), von den Klonen mit dem korrekt orientiertem Insert (Abb. 12, Gel II). Im Restriktionsverdau zeigen auch diese Klone zwei nah beieinander liegende Banden im mittleren Bereich des Gels (1.48kb und 1.3kb).

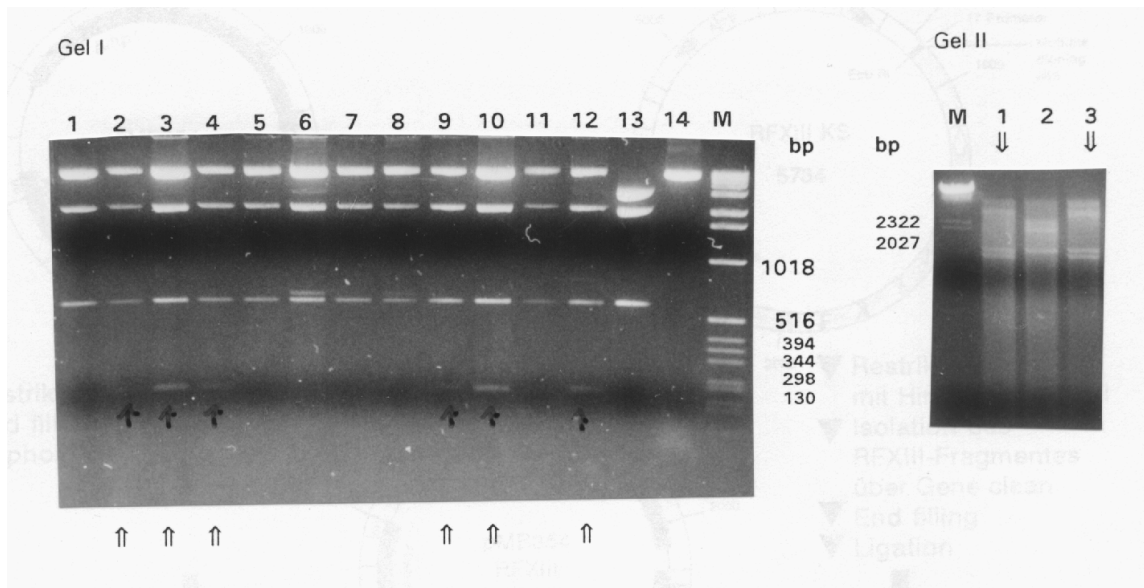


Abbildung 11: Gel I zeigt einen Pst I Verdau verschiedener Klone mit dem RFXIII pEMBLyex4 Konstrukt. Die Pfeile zeigen das 0.162 kb Fragment, das die Klone mit der falschen Orientierung der cDNA auszeichnet. Nähere Erklärungen siehe Text. M: 1kb Marker.

Gel II zeigt einen Eco RV Verdau verschiedener Klone mit der verkürzten RFXIII cDNA in pEMBLyex4. Die Pfeile kennzeichnen die Klone mit der korrekten Orientierung der cDNA. Nähere Erklärungen siehe Text. M: λ /Hinf III

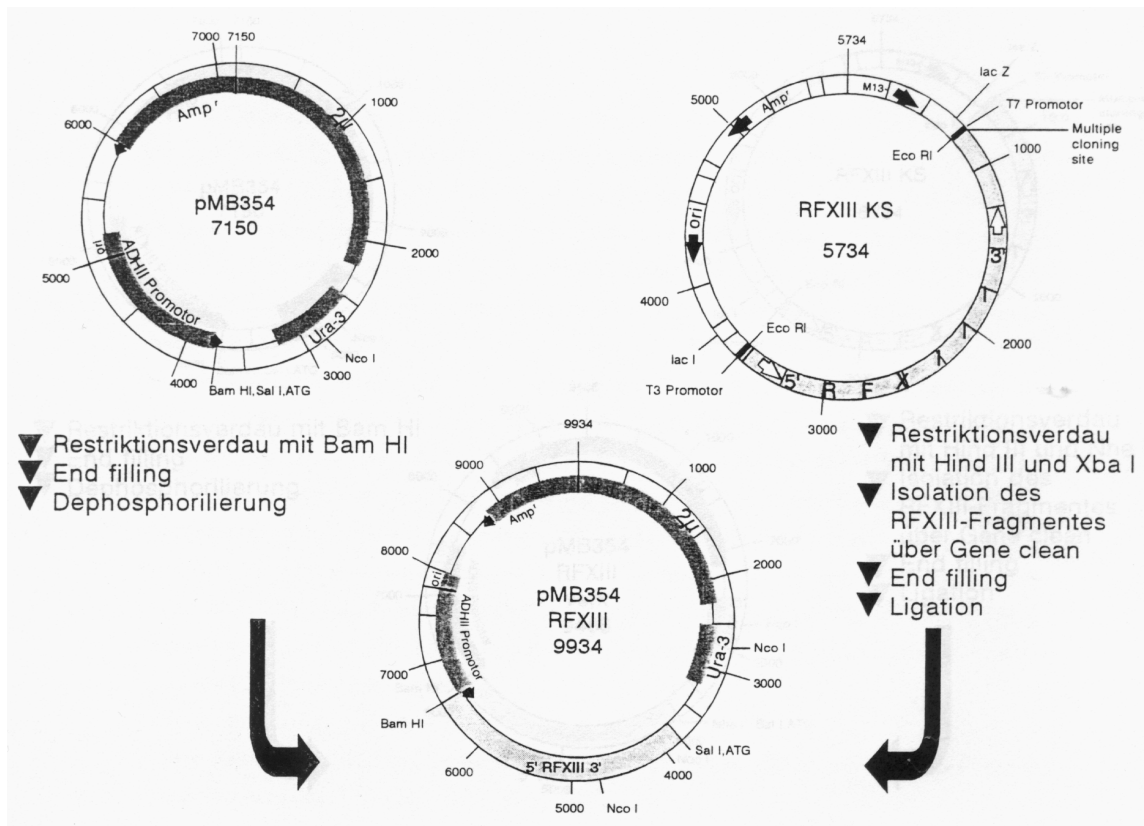


Abbildung 12: Klonierungsschema der RFXIII cDNA in den Expressionsvektor pMB354. Für die Klonierung wurde der Vektor (oben links) durch einen Restriktionsverdau mit Bam HI, ein end filling und eine Dephosphorilierung vorbereitet. Die RFXIII cDNA wurde über einen Hind III/Xba I Restriktionsverdau aus dem RFXIII KS Vektor (oben rechts) isoliert. Nach einem end filling des Inserts konnte die cDNA blunt end in den Vektor kloniert werden.

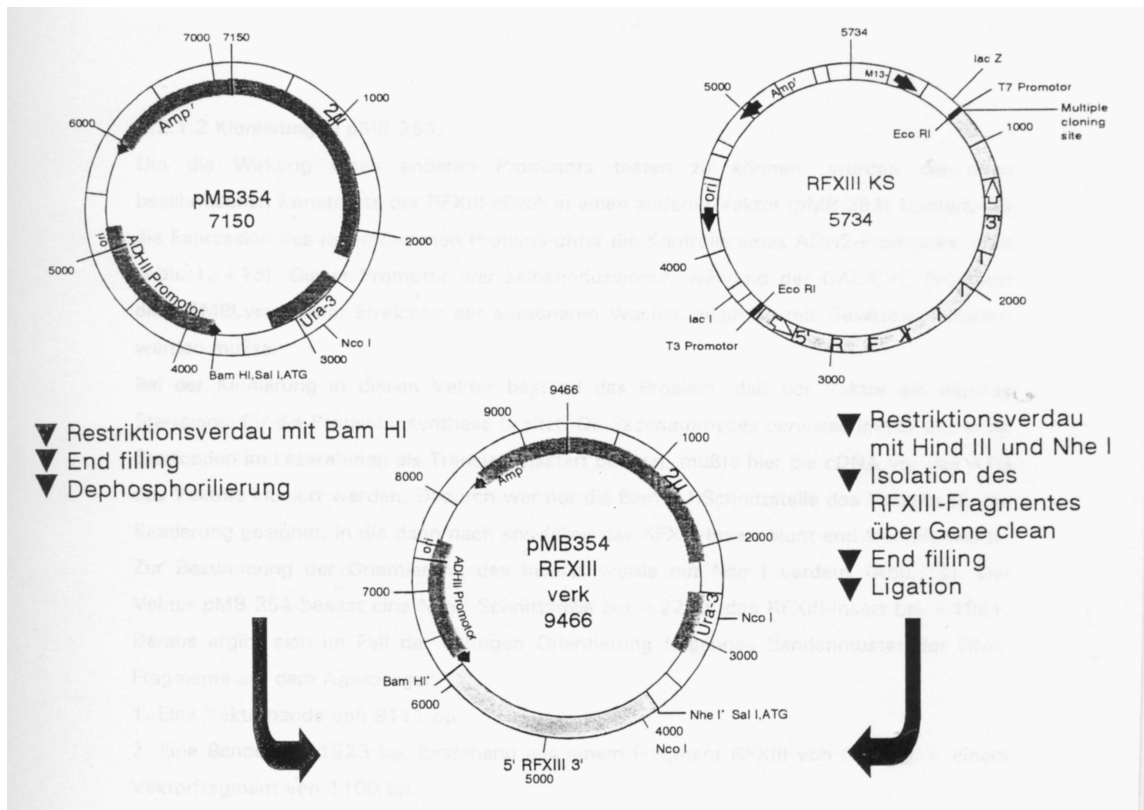


Abbildung 13: Klonierungsschema der 3' verkürzten RFXIII-cDNA in den Expressionsvektor pMB354. Für die Klonierung wurde der Vektor (oben links) durch einen Restriktionsverdau mit Bam HI, ein end filling und eine Dephosphorylierung vorbereitet. Die RFXIII-cDNA wurde über einen Hind III/Nhe I Restriktionsverdau aus dem RFXIII KS Vektor (oben rechts) isoliert und dabei gleichzeitig am 3' Ende verkürzt. Nach einem end filling des Inserts konnte die cDNA blunt end in den Vektor kloniert werden.

3.2.1.2 Klonierung in pMB 354:

Um die Wirkung eines anderen Promotors testen zu können, wurden die oben beschriebenen Konstrukte der RFXIII-cDNA in einen anderen Vektor (pMB 354) kloniert, der die Expression des rekombinanten Proteins unter die Kontrolle eines ADH2-Promotors stellt (Abb.:12+13). Dieser Promotor war selbstinduzierend, während der GAL/CYC Promotor des pEMBLyex4 beim Erreichen der stationären Wachstumsphase mit Galaktose induziert werden mußte.

Bei der Klonierung in diesen Vektor bestand das Problem, daß der Vektor ein eigenes Startsignal für die Proteinbiosynthese besitzt. Da *Saccharomyces cerevisiae* immer das erste Startcodon im Leserahmen als Translationsstart benutzt, mußte hier die cDNA vor das ATG des Vektors kloniert werden. Dadurch war nur die Bam H I Schnittstelle des Vektors für die Klonierung geeignet, in die dann nach end-filling das RFXIII-Insert blunt end kloniert wurde. Zur Bestimmung der Orientierung des Inserts wurde mit Nco I verdaut (Abb.:14). Der Vektor pMB 354 besitzt eine Nco I-Schnittstelle bei +2700, das RFXIII-Insert bei +1961. Daraus ergibt sich im Fall der richtigen Orientierung folgendes Bandenmuster der DNA-Fragmente auf dem Agarosegel:

1. Eine Vektorbande von 9111 bp
2. Eine Bande von 1923 bp, bestehend aus einem Fragment RFXIII von 823 bp + einem Vektorfragment von 1100 bp.

Im Fall der falschen Orientierung sähen die Größen der Fragmente anders aus:

1. Eine Vektorbande von 6873 bp
2. Eine Bande von 3061 bp, die aus RXIII-cDNA und einem Fragment Vektor besteht.

Klone mit falscher bzw. richtiger Orientierung des Inserts unterscheiden sich also durch den Abstand von Vektorbande und Insertbande: Im Fall der korrekten Orientierung sind die Abstände relativ groß, im Fall der falschen Orientierung deutlich kleiner (Abb.:14 Gel I, Bahnen 1-3)

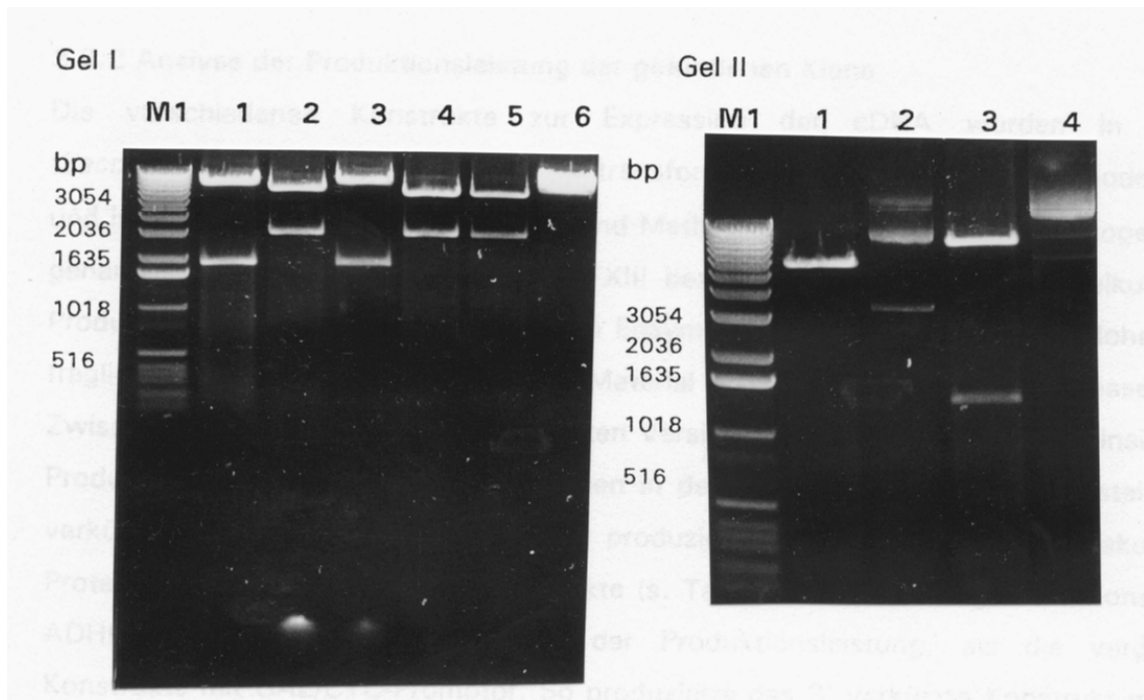
Da die Klonierung für die verkürzte RXIII-cDNA analog zur unverkürzten Version durchgeführt wurde, konnte auch hier die Orientierung des Inserts mit Nco I bestimmt werden (Abb.:14, Gel I, Bahnen 4+5 und Gel II): Im Fall der richtigen Orientierung ergab sich nach dem Restriktionsverdau folgendes Muster an DNA Fragmenten:

1. Eine Vektorbande von 9111 bp
2. Eine Insertbande mit 1355 bp, die deutlich kleiner ist als in der unverkürzten Version.

Im Fall der falschen Orientierung hat man mit sehr ähnlichen Fragmenten zu rechnen wie bei der unverkürzten cDNA:

1. Eine kleinere Vektorbande von 6305 bp
2. Eine Insertbande von 3061 bp.

Bei der Unterscheidung von richtig und falsch orientierten Inserts gelten dieselben Kriterien, wie bei den Klonen mit unverkürzter cDNA: Im Fall der richtigen Orientierung (Abb.:14, Gel II, Bahn 3) weisen Vektorbande und Insertbande einen deutlich größeren Abstand voneinander auf als im Fall der falschen Orientierung der cDNA (Abb.:14, Gel I, Bahnen 4+5).



| <u>Bahn</u> | <u>Klonnummer</u> | <u>Fragmente</u> | <u>Orientierung</u> richtig:+, falsch:- | <u>Kommentar</u> |
|-------------|--------------------------------|--|--|---|
| Gel I:1 | 3/1 | Vektorbande 9111bp Insertbande 1923bp | + | Die Klone mit den Nummern 3/1, 3/2, 3/4 sind Konstrukte mit vollständiger RFXIII cDNA |
| 2 | 3/2 | Vektorbande 6873bp Insertbande 3061bp | - | |
| 3 | 3/4 | Vektorbande 9111bp Insertbande 1923bp | + | |
| 4 | 4/3 | Vektorbande 6305bp Insertbande 3061bp | - | Die Klone mit den Nummern 4/1, 4/2, 4/3, 4/4 sind Konstrukte mit der verkürzten RFXIII cDNA |
| 5 | | Vektorbande 6305bp Insertbande 3061bp | | |
| 6 | nicht klonierter Vektor pMB354 | | | |
| Gel II:1 | 4/1 | Vektorbande | - leerer Vektor | Klon 4/1 unverdaut |
| 2 | 4/1 | | | |
| 3 | 4/2 | Vektorbande 9111bp Insertbande 1355bp | + | Klon 4/2 unverdaut |
| 4 | 4/2 | | | |

Abbildung 14: TAE Agarosegelelektrophorese verschiedener Klone von RFXIII-pMB354 Konstrukten. Die beiden Gele zeigen sowohl Konstrukte mit verkürzter wie auch mit unverkürzter cDNA. Beide Konstrukte wurden Nco I Kontrollverdaus unterzogen, um die Orientierung der cDNA im Expressionsvektor zu überprüfen. Spuren 1-3 auf Gel I zeigt Konstrukte mit vollständiger cDNA. Spuren 4+5 auf Gel I sowie Spuren 1-4 auf Gel II zeigen Konstrukte mit verkürzter cDNA. Weitere Einzelheiten sind der Beschriftungstabelle zu entnehmen.

3.2.2 Analyse der Produktionsleistung der gefundenen Klone

Die verschiedenen Konstrukte zur Expression der cDNA wurden in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* Cl3ABYS86) transformiert (vgl. Material und Methoden 2.2.4.2) und in der Schüttelkultur (vgl. Material und Methoden 2.2.4.1-2.2.4.3) angezogen. Die hier genannten Produktionsleistungen an RFXIII beziehen sich also auf Schüttelkulturen. Die Produktionsleistung eines Klones wird in Enzymeinheiten angegeben, die im Rohextrakt des fraglichen Klones im Berichromtest (vgl. Material und Methoden 2.2.5.4) gemessen wurden.

Zwischen der verkürzten und unverkürzten Version der RFXIII-cDNA waren hinsichtlich der Produktionsleistung keine Verbesserungen in der Produktionsleistung festzustellen, die 3' verkürzten Klone mit Gal/CYC Promotor produzierten sogar etwas weniger rekombinantes Protein als die 3' unverkürzten Konstrukte (s. Tabelle 8). Jedoch lagen die Konstrukte mit ADHII-Promotor deutlich höher in der Produktionsleistung, als die vergleichbaren Konstrukte mit GAL/CYC-Promotor. So produzierte das 3' verkürzte Konstrukt mit ADHII-Promotor etwa die dreifache Menge an rekombinantem Protein (0.9E/mL Kulturvolumen) gegenüber seinem Pendant mit GAL/CYC Promotor. Bei den unverkürzten Konstrukten war der Unterschied in der Produktionsleistung nicht so dramatisch, aber signifikant: Die Klone mit ADHII Promotor produzierten das 1.8-fache (0.9E/mL Kulturvolumen) an rekombinantem Protein gegenüber den Klonen mit GAL/CYC Promotor. Im t-Test war die Produktionsleistung des ADHII-Promotors auf dem 1%-Niveau signifikant höher als die des GAL/CYC-Promotors mit verkürzter cDNA ($t=4.93 > t_{26;0,001}$) bzw. des GAL/CYC-Promotors mit unverkürzter cDNA ($t=6.20 > t_{50;0,001}$). Dagegen bestand im t-Test zwischen der Produktionsleistung des ADHII-Promotors mit verkürzter und unverkürzter cDNA kein signifikanter Unterschied.

Für die Proteinreinigung wurde ein Klon fermentiert, der ein Zufallsfund war. Es war ein Klon mit dem pEMBLyex4 RFXIII Konstrukt, also mit unverkürzter cDNA und GAL/CYC Promotor, der etwa 5E/mL Kulturvolumen produzierte und damit in der Produktionsleistung mit dem Produktionsklon der Behringwerke für rekombinanten humanen FXIII vergleichbar war (7E rekombinantes Protein/mL Kulturvolumen in der Schüttelkultur), welcher als Positivkontrolle in den Expressionsexperimenten neben den RFXIII Klonen mitkultiviert wurde.

Tabelle 8: Produktionsleistungen verschiedener RFXIII Konstrukte

| Konstrukt | Promotor | untersuchte Klone | Produktionsleistung [E/mL Kulturvolumen] | Testverfahren |
|--|----------|-------------------|--|---------------|
| pEMBLyex4 RFXIII Hind III*/ Xba I* | Gal/Cycl | 68 | 0.5 +/- 0,23 | Berichrom® |
| pEMBLyex4 RFXIII Hind III*/ Nhe I* | Gal/Cycl | 26 | 0.3 +/- 0,11 | Berichrom® |
| pMB354 RFXIII Hind III*/ Xba I* | ADHII | 10 | 0.9 +/- 0,13 | Berichrom® |
| pMB354 RFXIII Hind III*/ Nhe I* | ADHII | 10 | 0.9 +/- 0,13 | Berichrom® |

Legende: *=Schnittstelle aufgefüllt.

3.3 Proteinreinigung und -charakterisierung

3.3.1 Proteinreinigung

Übersicht über den Ablauf des Reinigungsschemas:

1. Einstellung von pH-Wert und Leitfähigkeit

Da aufgrund der folgenden Ionenaustauschchromatographie nur ein Aufschlußpuffer mit mittlerer Salzkonzentration verwendet werden konnte, mußte nach dem Zellaufbruch der pH-Wert des Zellysates korrekt eingestellt werden. Die Hefezellen besitzen ein saures intrazelluläres Milieu, das den pH-Wert des Lysates um eine pH-Stufe absenken kann. Die Leitfähigkeit mußte wegen der sich anschließenden Anionenaustauschchromatographie auf einen geringen Wert eingestellt werden, um eine gute Kapazität der Säule zu erzielen.

2. DEAE Chromatographie

Diese Chromatographie wurde unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wie im Reinigungsschema für rhu-FXIII. Da der RFXIII fester an die Säule gebunden wurde als der rhu-FXIII, konnte hier mit einer höheren Salzkonzentration gewaschen werden.

3. Ammoniumsulfatfällung

Die Fraktionen von der Säule wurden nach Aktivität (nicht nach spezifischer Aktivität!) vereinigt und gefällt. Dadurch erhielt man eine quantitative Fällung des RFXIII.

4. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die hydrophobe Interaktionschromatographie (Phenylsepharose) wurde mit einer möglichst geringen Menge Gesamtprotein/ ml Gel durchgeführt, um eine gute Trennung zu erreichen.

5. Fällung am isoelektrischen Punkt.

Bei pH 5.0 fiel das Protein schnell (innerhalb von 30 Stunden) aus und konnte mit einer Ausbeute von 60-80% des in die Fällung eingesetzten Materials wieder in Lösung gebracht werden.

6. Cellufine Chromatographie

Diese Chromatographiemethode stellt eine Mischform zwischen Molekularsieb und Affinitätschromatographie dar. RFXIII eluierte etwas verzögert von der Säule. Der Reinigungseffekt dieser Chromatographiemethode ist zwar nicht mit einem Ionenaustauscher zu vergleichen, aber das eingesetzte Protein wird fast vollständig (>90%) wieder zurückgewonnen.

Zellaufschluß: Die effizienteste Aufschlußmethode der Wirtszellen wurde empirisch ermittelt. Nachdem die Testansätze mit kleineren Kulturvolumina in der Zelmühle nur einen Aufschluß von 47% der lebensfähigen Zellen ergaben, wurde nach der Fermentation die Biomasse mit der French-pressure-cell bei 1000 bar aufgeschlossen.

Puffer: Der Puffer wurde so gewählt, daß einerseits die Pufferkapazität ausreichend war, um eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich beim Aufschluß zu verhindern, andererseits durfte die Salzkonzentration des Puffers nicht so groß sein, daß vor dem Auftrag auf den ersten Ionenaustauscher noch der Puffer durch Dialyse oder Diafiltration gewechselt werden mußte. Da der größte Teil der Arbeitsschritte der Proteinreinigung bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, mußte darauf geachtet werden, daß die Reinigungsprozedur schnell durchzuführen war, um unnötige Aktivitätsverluste durch ein langwieriges Reinigungsschema zu vermeiden. Auf den üblichen Zusatz von EDTA im Puffer, um Proteasen durch den Mangel an zweiwertigen Ionen zu inhibieren, wurde bewußt verzichtet, da der Produktionsorganismus ohnehin Protease defizient war und divalente Metallionen FXIII stabilisieren. (Mary, Achyuthan, Greenberg, 1988) Als Aufschlußpuffer diente daher ein 0.2 M K_2HPO_4 Puffer, pH 8.0. Trotz der guten Pufferkapazität des Aufschlußpuffers mußte der Rohextrakt nach Zellaufschluß (vgl. Abb.:16, Bahnen 1+2), Fällung der groben Bestandteile mit PEG 6000 (vgl. Abb.:16, Bahn 3) und Sterilfiltration, immer noch nachgestellt werden. Durch die pH Verschiebung um etwa eine pH Einheit, sowie die Einstellung der Leitfähigkeit des Rohextraktes auf etwa 10 mS/cm² fielen immer noch Lysatbestandteile aus, die durch eine hochtourige Zentrifugation von dem Rohextrakt abgetrennt wurden.

DEAE Chromatographie: Analog zum Reinigungsverfahren des humanen FXIII stand auch hier als erster Chromatographieschritt ein DEAE-Ionenaustauscher, der aber mit einer höheren Salzkonzentration eluiert werden mußte (Abb.:15; Abb.:16, Bahn 4). Anders als der rhu-FXIII eluierte der RFXIII erst bei einer KCl Konzentration von 0.3M/L. Daran schloß sich eine Ammoniumsulfatfällung an (Abb.: 16, Bahn 5), die mit einer Salzmenge von 30g/100 ml durchgeführt wurde (vgl. Material und Methoden 2.2.5). In diesem Schritt stand die Ankonzentrierung des Materials sowie eine möglichst hohe Ausbeute im Vordergrund, die Reinigungswirkung war hier eher gering, so wurde die spezifische Aktivität nur verdoppelt. In der Elektrophorese nach der Basisreinigung (Abb.: 16), die mit der Ammoniumsulfatfällung abgeschlossen war, sind im Coomassie gefärbten SDS-Gel noch zahlreiche Banden an Verunreinigungen mit Hefeproteinen zu erkennen. Im Westernblot lassen sich diese Banden mit

einem polyklonalen Antiserum gegen *Saccharomyces cerevisiae* CI3ABYS86 anfärben (vgl Abb.:20)

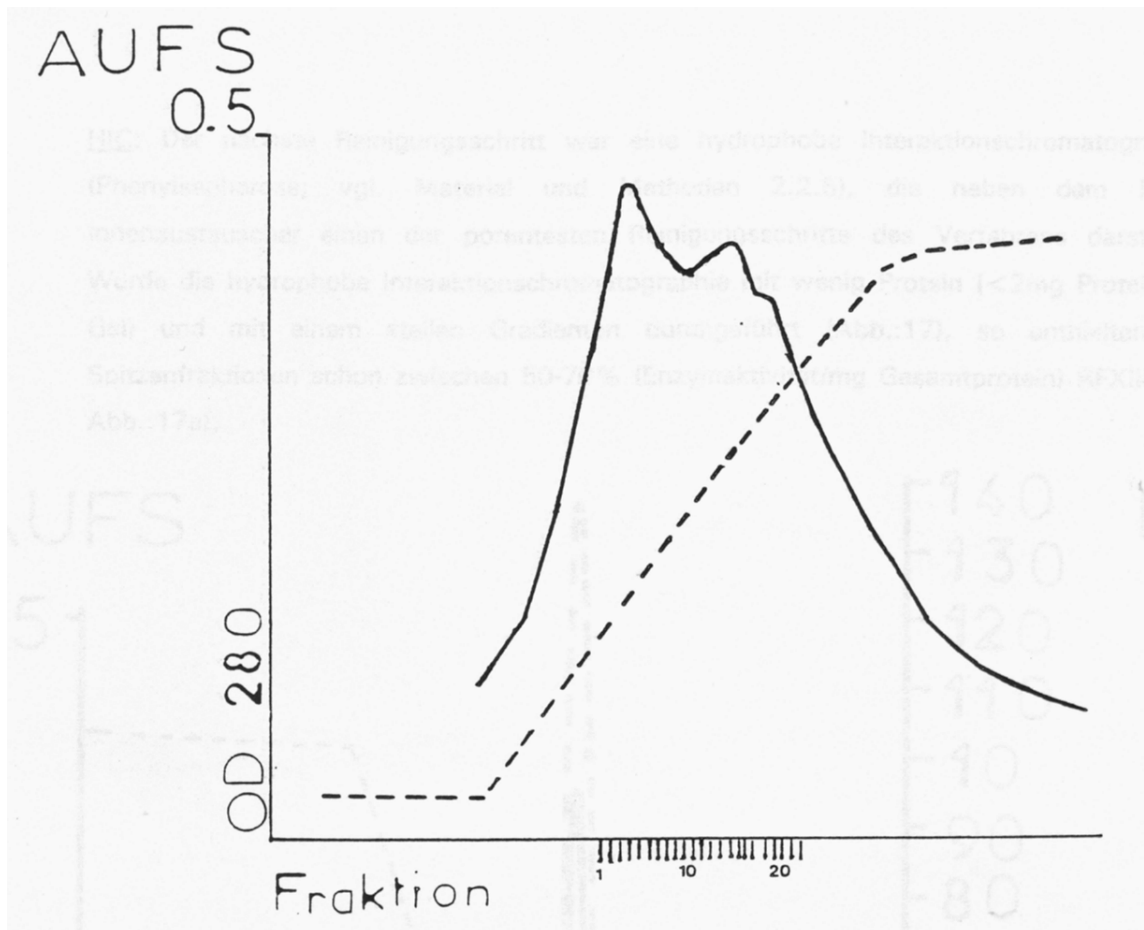


Abbildung 15: DEAE Chromatogramm von RFXIII aus Hefelysate. Die gestrichelte Kurve zeigt den Anstieg der Leitfähigkeit während der Durchführung der Chromatographie (vgl. Material und Methoden 2.2.5). Es wurde mit einem KCl Gradienten von 0.2M-0.5M eluiert. Die im Chromatogramm eingezeichneten Fraktionen enthielten RFXIII Aktivität und wurden vereinigt und bilden den DEAE Pool in Abb.:16. (AUFS: Absorbance units full scale)

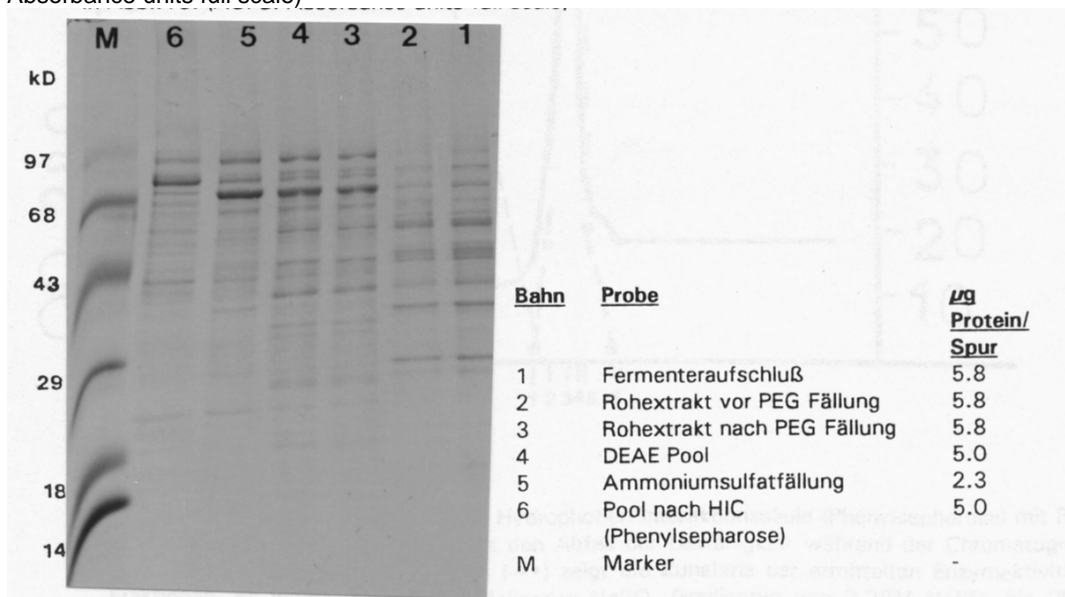


Abbildung 16: SDS Gelelektrophorese von RFXIII nach der Basisreinigung.

HIC: Der nächste Reinigungsschritt war eine hydrophobe Interaktionschromatographie (Phenylsepharose; vgl. Material und Methoden 2.2.5), die neben dem DEAE Ionenaustauscher einen der potentesten Reinigungsschritte des Verfahrens darstellte. Wurde die hydrophobe Interaktionschromatographie mit wenig Protein (<2mg Protein/mL Gel) und mit einem steilen Gradienten durchgeführt (Abb.:17), so enthielten die Spitzenfraktionen schon zwischen 50-70% (Enzymaktivität/mg Gesamtprotein) RFXIII (vgl Abb.:17a).

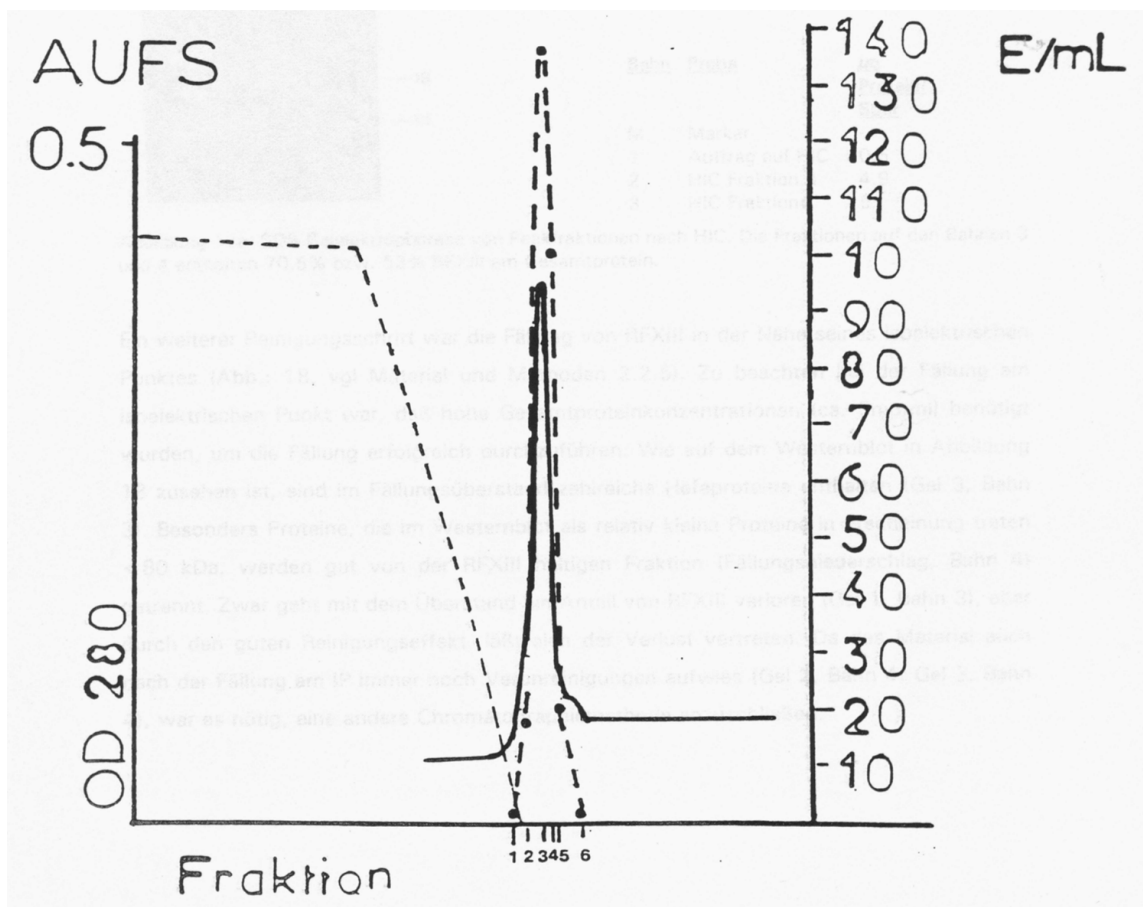


Abbildung 17: Chromatogramm einer Hydrophoben Interaktionssäule (Phenylsepharose) mit RFXIII aus Hefelysat. Die gestrichelte Linie zeigt den Abfall der Leitfähigkeit während der Chromatographie an. Die Linie über dem Chromatogramm (---•) zeigt die Zunahme der ermittelten Enzymaktivität in den Fraktionen. Es wurde mit einem abfallenden NaSO_4 Gradienten von 0.38M NaSO_4 bis 0M NaSO_4 eluiert. (AUFS: Absorbance units full scale)

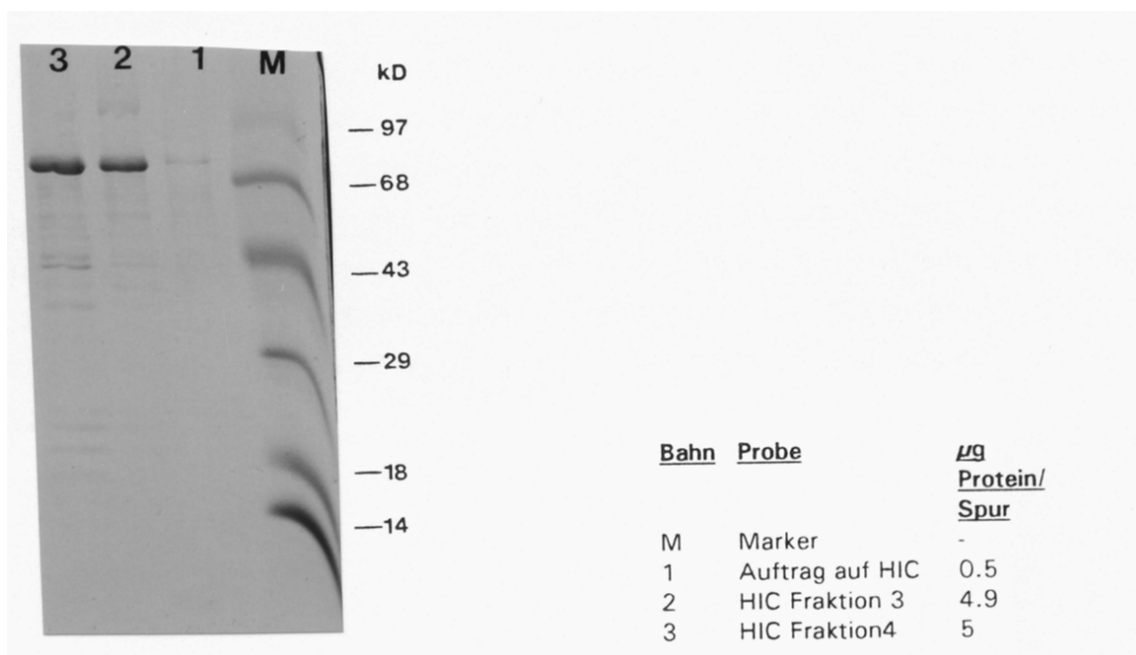
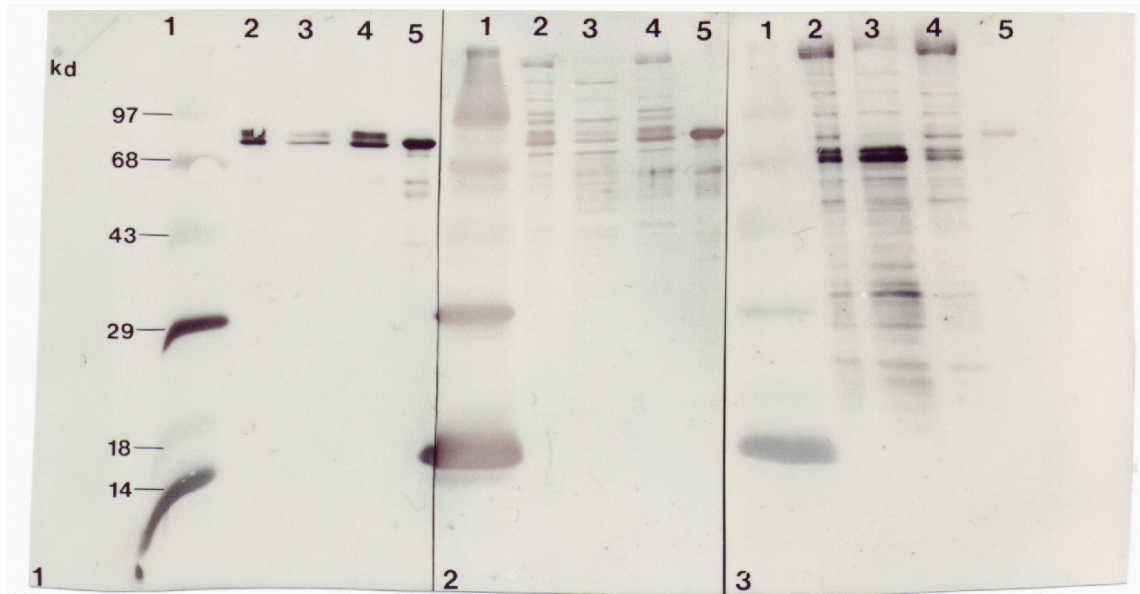


Abbildung 17a: SDS Gelelektrophorese von Peakfraktionen nach HIC. Die Fraktionen auf den Bahnen 3 und 4 enthalten 70.5% bzw. 53% RFXIII am Gesamtprotein.

Ein weiterer Reinigungsschritt war die Fällung von RFXIII in der Nähe seines isoelektrischen Punktes (Abb.: 18, vgl. Material und Methoden 2.2.5). Zu beachten bei der Fällung am isoelektrischen Punkt war, daß hohe Gesamtproteinkonzentrationen (ca. 5mg/ml) benötigt wurden, um die Fällung erfolgreich durchzuführen. Wie auf dem Westernblot in Abbildung 18 zusehen ist, sind im Fällungsüberstand zahlreiche Hefeproteine enthalten (Gel 3, Bahn 3). Besonders Proteine, die im Westernblot als relativ kleine Proteine in Erscheinung treten <80 kDa, werden gut von der RFXIII haltigen Fraktion (Fällungsniederschlag, Bahn 4) getrennt. Zwar geht mit dem Überstand ein Anteil von RFXIII verloren (Gel 1, Bahn 3), aber durch den guten Reinigungseffekt, läßt sich der Verlust vertreten. Da das Material auch nach der Fällung am IP immer noch Verunreinigungen aufwies (Gel 2, Bahn 4; Gel 3, Bahn 4), war es nötig, eine andere Chromatographiemethode anzuschließen.



| <u>Gel</u> | <u>Bah</u> | <u>Probe</u> | <u>µgProtein</u> <u>/Spur</u> | <u>Nachweismethode</u> |
|------------|------------|------------------------------------|----------------------------------|---|
| 1 | 1 | Marker | - | Westernblot mit monoklonalem FXIII Antikörper (FXIII/18) |
| | 2 | RFXIII n. HIC | 1 | |
| | 3 | Überstand n. Fällung am IP | 1 | |
| | 4 | Niederschlag aus der Fällung am IP | 1 | |
| | 5 | rhu FXIII | 2 | |
| 2 | 1 | Marker | - | Gesamtproteinfärbung des gebloteten Gels mit kolloidalem Gold (Auro dye, Janssen) |
| | 2 | RFXIII n. HIC | 1 | |
| | 3 | Überstand n. Fällung am IP | 1 | |
| | 4 | Niederschlag aus der Fällung am IP | 1 | |
| | 5 | rhu FXIII | 2 | |
| 3 | 1 | Marker | - | Hefeprotein Nachweis mit polyklonalem Antiserum aus Kaninchen gegen den Produktionsstamm |
| | 2 | RFXIII n. HIC | 1 | |
| | 3 | Überstand n. Fällung am IP | 1 | |
| | 4 | Niederschlag aus der Fällung am IP | 1 | |
| | 5 | rhu FXIII | 2 | |

Abbildung 18: SDS-Gelelektrophorese mit Westernblot von verschiedenen RFXIII haltigen Fraktionen nach der Fällung am isoelektrischen Punkt. Zur Durchführung der Elektrophorese siehe unter Material und Methoden 2.2.5.1. Der Westernblot sollte zeigen inwieweit Hefeproteine durch die Fällung am isoelektrischen Punkt von RFXIII haltigen Fraktionen getrennt werden können.

Die Kombination mit einer Cellufine Chromatographie (vgl Material und Methoden 2.2.5) erwies sich hier als sinnvoll (Abb.:19). Diese Chromatographiemethode hat den Vorteil, daß sie unter sehr schonenden Bedingungen durchgeführt werden kann und trotzdem ein recht guter Reinigungseffekt erreicht wurde, da RFXIII - ähnlich wie rhu-FXIII - auf der Säule etwas zurückgehalten wurde und so die Verunreinigungen vor dem Protein von der Säule gewaschen wurden. Am Ende der Reinigungsprozedur (Abb. 20) besitzt der RFXIII eine Reinheit von 99.2%(vgl Fremdproteinbestimmung 3.3.2.5) bei einer Ausbeute von 2% von der Gesamtaktivität.

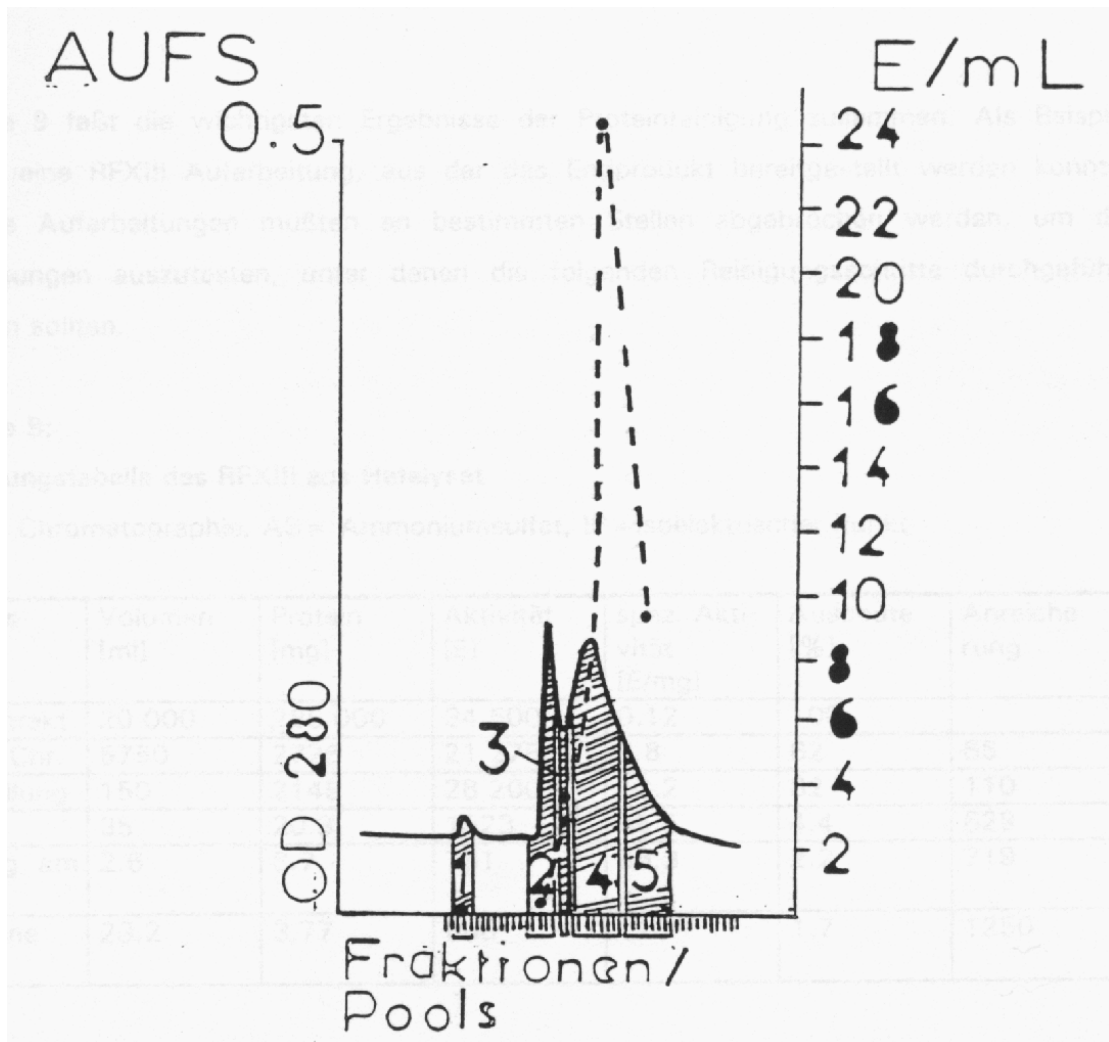


Abbildung 19: Chromatogramm einer Trennung von RFXIII über Cellufine. Die Enzymaktivität eluiert mit den Pools 4+5 von der Säule. In diesen Fraktionen wurde die gesamte auf die Säule aufgetragene Enzymaktivität zurückgewonnen. (AUFS: Absorbance units full scale)

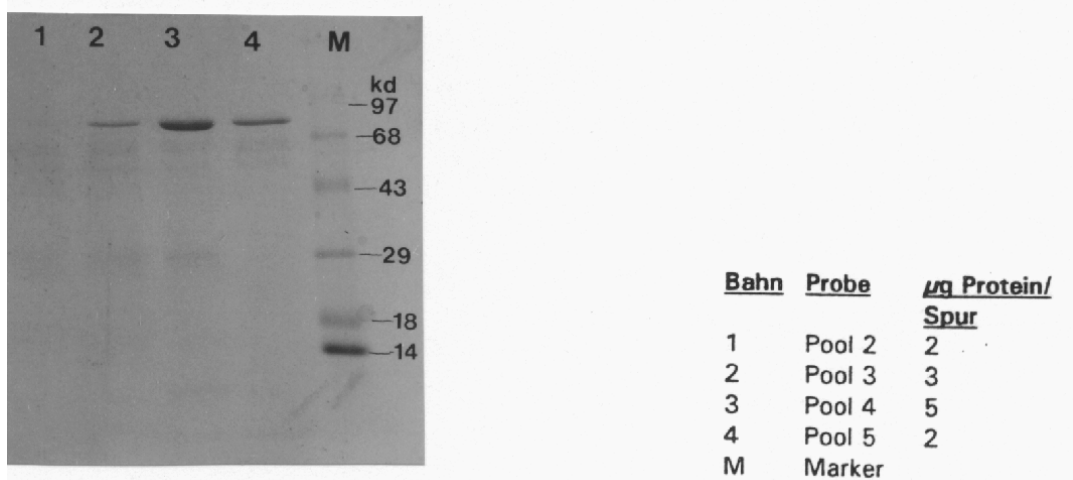


Abbildung 19a: Coomassie gefärbtes SDS-Gel der verschiedenen Pools nach der Cellufine Chromatographie. Bahnen 3 und 4 zeigen zur Homogenität gereinigten RFXIII und damit das Endprodukt der Reinigungsprozedur.

Tabelle 9 faßt die wichtigsten Ergebnisse der Proteinreinigung zusammen. Als Beispiel diene eine RFXIII Aufarbeitung, aus der das Endprodukt bereitgestellt werden konnte. Andere Aufarbeitungen mußten an bestimmten Stellen abgebrochen werden, um die Bedingungen auszutesten, unter denen die folgenden Reinigungsschritte durchgeführt werden sollten.

Tabelle 9:

Reinigungstabelle des RFXIII aus Hefelysat

Chr.= Chromatographie, AS= Ammoniumsulfat, IP=isoelektrischer Punkt

| Arbeits-schritt | Volumen [ml] | Protein [mg] | Aktivität [E] | spez. Aktivität [E/mg] | Ausbeute [%] | Anreicherung |
|-----------------|--------------|--------------|---------------|------------------------|--------------|--------------|
| Rohextrakt | 20 000 | 286 000 | 34 500 | 0.12 | 100 | |
| DEAE Chr. | 5750 | 2726 | 21 275 | 7.8 | 62 | 65 |
| AS Fällung | 150 | 2145 | 28 200 | 13.2 | 82 | 110 |
| HIC | 35 | 20.3 | 1523 | 75.5 | 4.4 | 629 |
| Fällung am IP | 2.6 | 8.7 | 761 | 86.3 | 2.2 | 719 |
| Cellufine Chr. | 23.2 | 3.77 | 586 | 116 | 1.7 | 1250 |

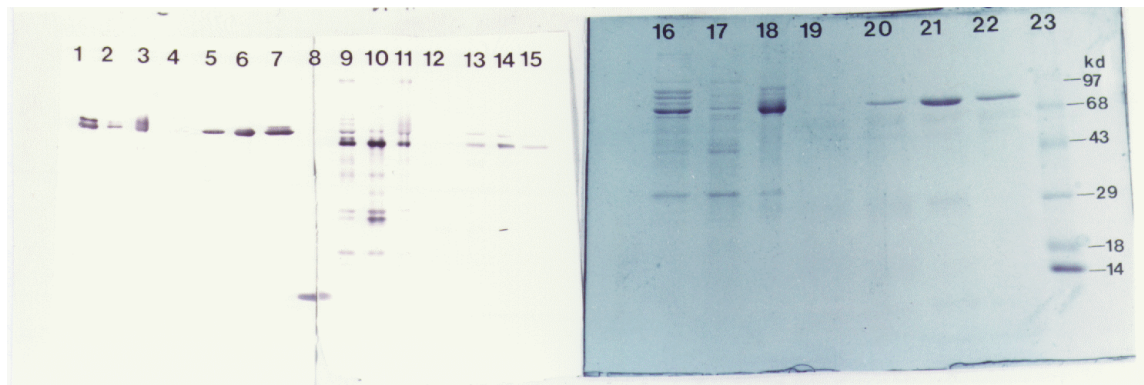
3.3.2 Proteincharakterisierung

3.3.2.1 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Das Coomassie gefärbte SDS-Gel zeigt nach dem Ende der Reinigung eine Bande bei 82.8kDa. Dieses Protein ist als RFXIII anzusprechen, da es sich auch mit einem monoklonalen Antikörper gegen rhu-FXIII (FXIII/18) anfärben läßt (s. Abb.:20). Außerdem stimmt das in der SDS-PAGE ermittelte relative Molekulargewicht gut mit dem theoretischen Molekulargewicht von RFXIII überein (vgl. unter 3.2.3).

Im Westernblot finden sich je nach Reinigungsstufe neben einer RFXIII Doppelbande bei 85kDa und 80kDa zahlreiche Banden, die als Verunreinigungen von Hefeproteinen anzusprechen sind und sich mit einem Antiserum gegen den Wirtsorganismus anfärben lassen.

Die Doppelbande läßt sich als stabiles Protein mit Aktivierungspeptid einerseits und als aktives Protein ohne Aktivierungspeptid andererseits ansprechen, da nicht nur das ermittelte Molekulargewicht für den RFXIII mit und ohne Aktivierungspeptid spricht, sondern sich beide Banden im Westernblot gut mit einem monoklonalen Antikörper (FXIII/18) gegen rhu-FXIII anfärben lassen (Abb.:20). Erwartungsgemäß färbt das Antiserum gegen Hefe diese beiden Proteinbanden nicht, bzw. deutlich schwächer als die Hefeproteine an. Eine leichte Kreuzreaktion des Antihefeserums mit RFXIII und rhu-FXIII war nicht ganz auszuschließen, wie an dem hochreinen rhu-FXIII zu sehen ist, der als Referenz auf jedem SDS Gel mitgeführt wurde. Auffällig ist, daß die FXIII Doppelbande bis nach der HIC in den Präparationen vertreten ist, aber nach der Fällung am isoelektrischen Punkt (Abb.: 20) verschwindet.

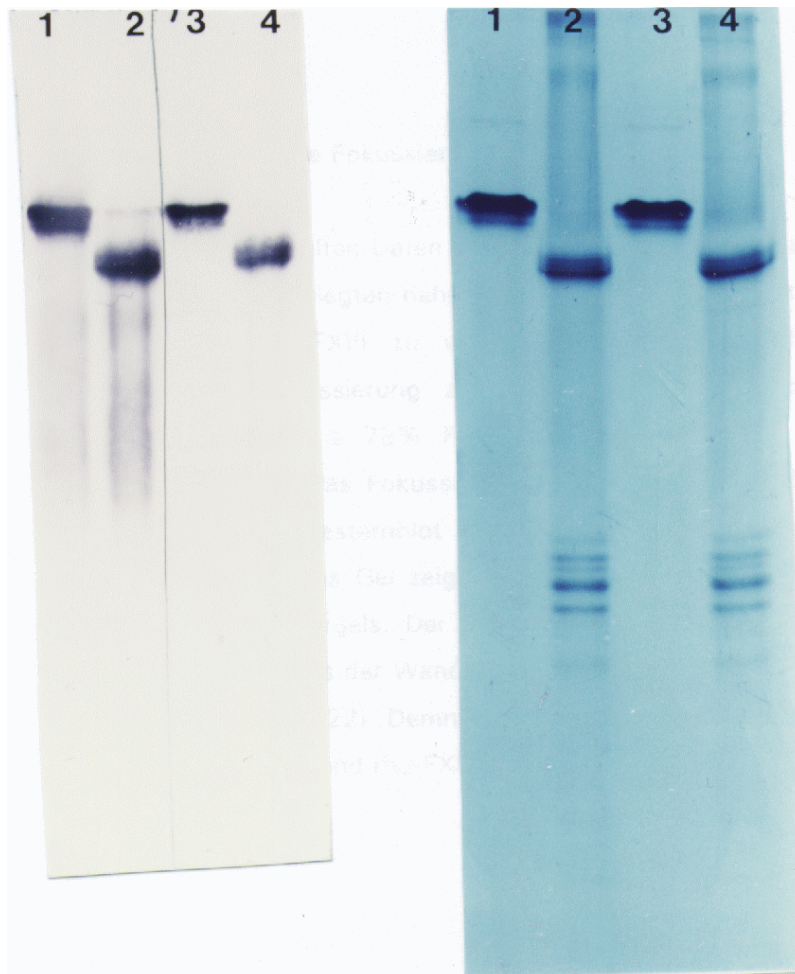


| Bahn | Probe | µg Protein/ Spur | Nachweismethode |
|-------------|------------------------------------|---------------------------------|---|
| 1 | RFXIII n. HIC | 1 | Monoklonaler FXIII Antikörper (FXIII/18) |
| 2 | Überstand aus der Fällung am IP | 1 | |
| 3 | Sediment aus der Fällung am IP | 1 | |
| 4 | RFXIII n. Cellufine Pool 2 | 1 | |
| 5 | RFXIII n, Cellufine Pool 3 | 1 | |
| 6 | RFXIII n, Cellufine Pool 4 | 1 | |
| 7 | RFXIII n, Cellufine Pool 5 | 1 | |
| 8 | Marker | 1 | |
| 9 | RFXIII n. HIC | 1 | polyklonales Antiserum gegen den Produktionsorganismus |
| 10 | Überstand aus der Fällung am IP | 1 | |
| 11 | Sediment aus der Fällung am IP | 1 | |
| 12 | RFXIII n. Cellufine Pool 2 | 1 | |
| 13 | RFXIII n, Cellufine Pool 3 | 1 | |
| 14 | RFXIII n, Cellufine Pool 4 | 1 | |
| 15 | RFXIII n, Cellufine Pool 5 | 1 | Coomassie Färbung |
| 16 | Marker | - | |
| 17 | RFXIII n. HIC | 5 | |
| 18 | Überstand aus der Fällung am IP | 5 | |
| 19 | Sediment aus der Fällung am IP | 5 | |
| 20 | RFXIII n. Cellufine Pool 2 | 2 | |
| 21 | RFXIII n, Cellufine Pool 3 | 3 | |
| 22 | RFXIII n, Cellufine Pool 4 | 5 | |
| 23 | RFXIII n, Cellufine Pool 5 | 2 | |
| 24 | Marker | - | |

Abbildung 20: SDS Gelelektrophorese verschiedener Reinigungsstufen aus der Hochreinigung von RFXIII

3.3.2.2 Nativ Gelelektrophorese

Erste Hinweise auf einen deutlichen Unterschied zwischen rhu-FXIII und RFXIII hinsichtlich der Ladung fanden sich in der DEAE Chromatographie (vgl.3.5.1). In der Nativ-Elektrophorese (Abb.:21) wurde dieser Hinweis bestätigt. Dort zeigten rhu-FXIII und RFXIII ein sehr deutlich voneinander verschiedenes Laufverhalten. RFXIII bleibt viel näher zur Anode hin orientiert als rhu-FXIII. In der Nativ-Elektrophorese wurde RFXIII unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen, was das Laufverhalten des Proteins nicht beeinflusst. Auch der humane FXIII zeigt keine Unterschiede im Laufverhalten mit und ohne Reduktionsmittel. Demnach besitzen beide Proteine keine intramolekularen S-S Brücken.



1

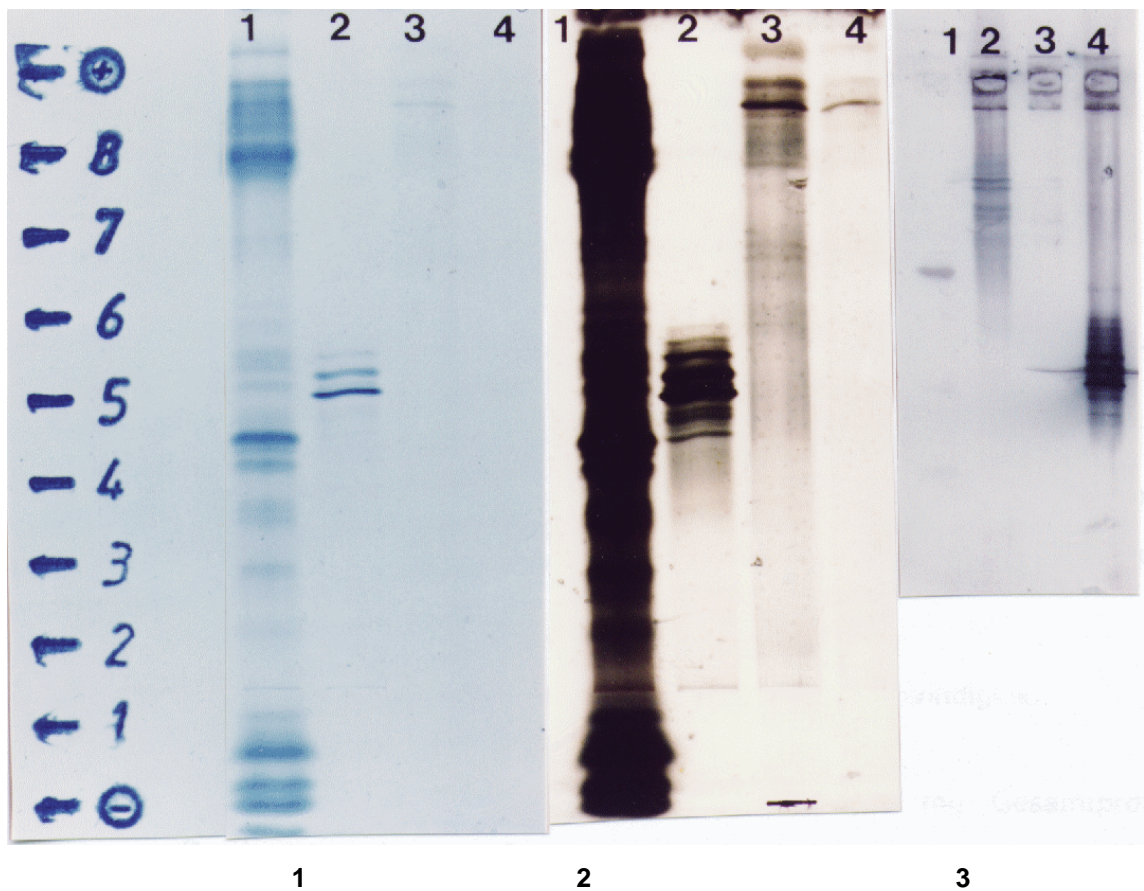
2

| <u>Gel</u> | <u>Bahn</u> | <u>Probe</u> | <u>µg Protein/ Spur</u> | <u>Kommentar</u> |
|------------|-------------|---------------|-----------------------------|--|
| 1 | 1 | rhu FXIII | 10 | nicht reduziert |
| | 2 | RFXIII n. HIC | 12 | nicht reduziert |
| | 3 | rhu FXIII | 10 | reduziert |
| | 4 | RFXIII n. HIC | 10 | reduziert |
| 2 | 1 | rhu FXIII | 0.5 | poyklonales FXIII Antiserum aus Kaninchen |
| | 2 | RFXIII n. HIC | 0.5 | poyklonales FXIII Antiserum aus Kaninchen |
| | 3 | rhu FXIII | 0.5 | monoklonaler FXIII Antikörper FXIII/18 |
| | 4 | RFXIII n. HIC | 0.5 | monoklonaler FXIII Antikörper FXIII/18 |

Abbildung 21: Nativ Elektrophorese von RFXIII nach HIC. Gel 1: Nativ Elektrophorese nach Coomassie Färbung. Gel 2: Nativ Elektrophorese nach Westernblot. Im Westernblot wurden zwei verschiedenen Nachweisantikörper verwendet: Einmal ein polyklonales FXIII Antiserum aus Kaninchen, zum anderen ein monoklonaler FXIII Antikörper.

3.3.2.3 Isoelektrische Fokussierung und Westernblot

Die empirisch ermittelten Daten beim Aufbau des Reinigungsschemas und das Ergebnis der nativ Elektrophorese legten nahe, den isoelektrischen Punkt von RFXIII zu bestimmen und mit dem von rhu-FXIII zu vergleichen. Um das Laufverhalten des RFXIII in der isoelektrischen Fokussierung zu beobachten, wurden zunächst zwei relativ unreine Fraktionen (Pool III \cong 73% RFXIII am Gesamtprotein, Pool IV \cong 95% RFXIII am Gesamtprotein) auf das Fokussiergel aufgetragen (Abb.:22). Nach dem Lauf wurden die Banden über den Westernblot mit einem Kaninchen-anti-rhu-FXIII-Antiserum identifiziert (Abb. 22, Gel 3). Das Gel zeigt einen deutlichen Shift der RFXIII Banden in den sauren Bereich des Fokussiergels. Der isoelektrische Punkt wurde anhand der Regressionskurve bestimmt, die sich aus der Wanderungsstrecke und dem auf der Geloberfläche gemessenen pH-Wert ergab (Abb. 22). Demnach liegt der isoelektrische Punkt von RFXIII bei einem pH-Wert von 5.41, während rhu-FXIII einen isoelektrischen Punkt von 6.2 hat.



| <u>Gel</u> | <u>Bahn</u> | <u>Probe</u> | <u>Nachweismethode</u> |
|------------|-------------|---------------------|--|
| 1 | 1 | Marker | Coomassie Färbung |
| | 2 | rhu FXIII | |
| | 3 | RFXIII n. Cellufine | |
| | 4 | RFXIII n. Cellufine | |
| 2 | 1 | Marker | Silber Färbung (silver stain kit, Amersham) |
| | 2 | rhu FXIII | |
| | 3 | RFXIII n. Cellufine | |
| | 4 | RFXIII n. Cellufine | |
| 3 | 1 | Marker | Westernblot gegen monoklonalen FXIII Antikörper (FXIII/18) |
| | 2 | rhu FXIII | |
| | 3 | RFXIII n. Cellufine | |
| | 4 | RFXIII n. Cellufine | |

Abbildung 22: Isoelektrische Fokussierung von RFXIII

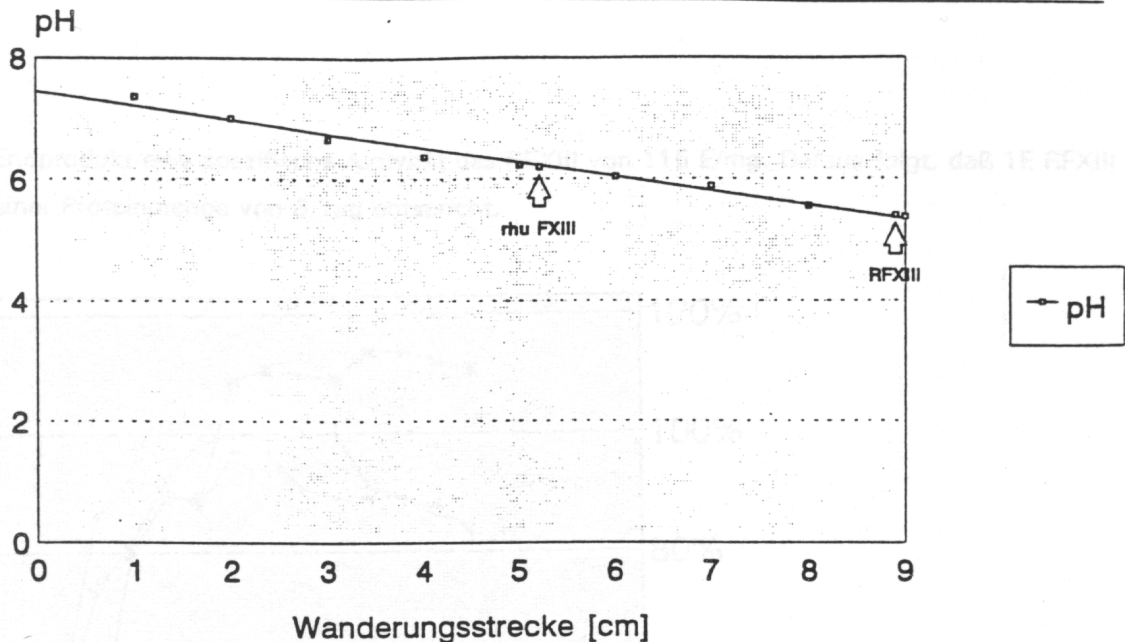


Abbildung 22a: Eichkurve zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes von RFXIII. Die Eichkurve wurde durch eine Spannungsmessung auf der Oberfläche des IEF Gels nach der Fokussierung ermittelt. Die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte von RFXIII und rhu FXIII sind auf der Grafik hervorgehoben.

3.3.2.4 Spezifische Aktivität und Aktivierungsgeschwindigkeit

Die spezifische Aktivität wird in Einheiten pro mg Gesamtprotein angegeben. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde ein Aktivitätstest (Berichrom®) von RFXIII durchgeführt (Abb.:23). Da der FXIII-Aktivitätstest ein kinetischer Test ist (vgl. 2.13), mußte zur Bestimmung der spezifischen Aktivität, der optimale Meßbereich ermittelt werden. Dazu wurde die Reaktionszeit nicht nach standardisierten Zeitpunkten beendet, sondern der gesamte Testverlauf protokolliert, um den linearen Bereich der Kinetik zu bestimmen. Gleichzeitig wurde der Test bei zwei verschiedenen Kalziumionenkonzentrationen (4 und 11mM) durchgeführt. Der so optimierte Aktivitätstest ergab einen optimalen Meßbereich von 12-17 min Inkubationszeit und eine optimale Kalziumionenkonzentration von 4 mM. Im Aktivitätstest wurde zum Vergleich auch noch humanes Standardplasma (als Bezugsgröße, auf die der Test ausgerichtet ist) und rekombinanter humaner FXIII untersucht. RFXIII erreicht im Aktivitätstest schneller die volle Aktivität als die beiden humanen Proben. Während RFXIII schon nach drei Minuten die maximale Aktivität erreicht, brauchen das humane Standardplasma 5min und der rhu-FXIII 7min zum Erreichen der vollen Aktivität. (Abb.: 23) Das Endprodukt hatte eine Aktivität von 20.31 E/ml bei einer Gesamtproteinkonzentration von 0.175 mg/ml (Ermittelt durch die BCA Methode, PIERCE). Bei einer Reinheit des Endproduktes von 99.2% (Fremdprotein ELISA) sind von 0.175 mg Gesamtprotein 0.174 mg RFXIII. Demnach hatte das Endprodukt eine spezifische

Aktivität des RFXIII von 115 E/mg. Daraus folgt, daß 1E RFXIII einer Proteinmenge von 8.7µg entspricht.

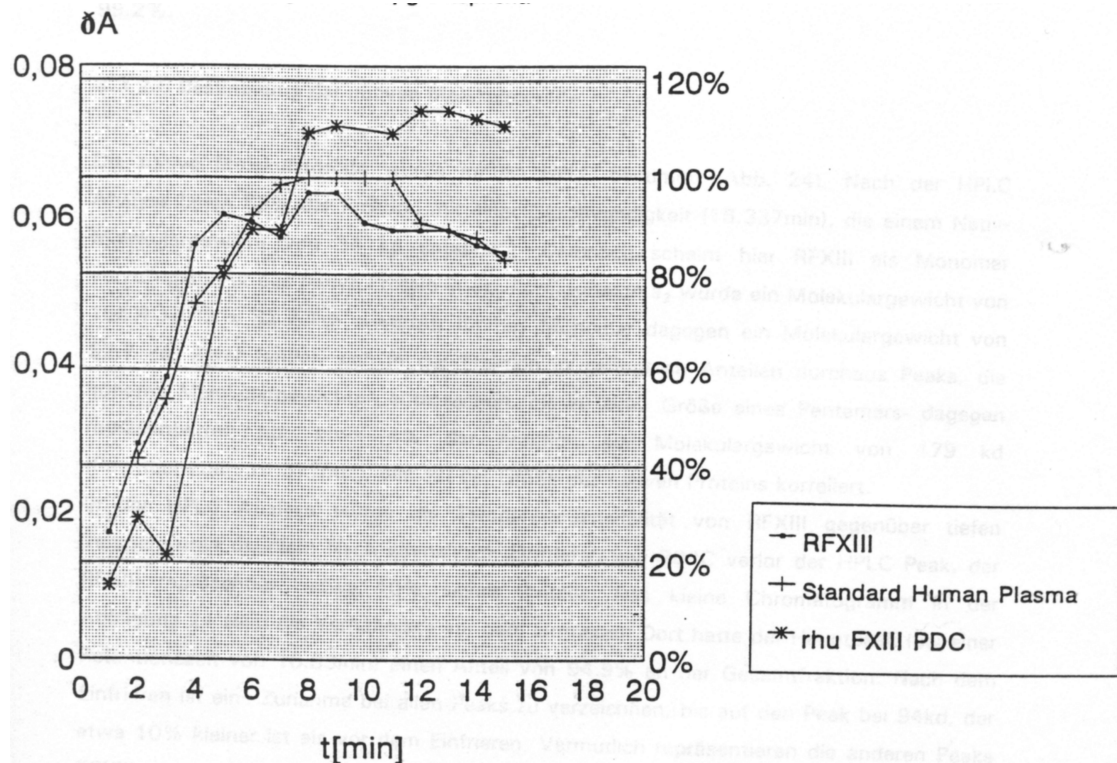


Abbildung 23: Aktivierung von RFXIII im Vergleich mit humanem Spenderplasma und rhu FXIII, gemessen in einem modifizierten Berichromtest. Zu den Versuchsbedingungen siehe Material und Methoden unter 2.2.5.4 und Ergebnisse unter 3.3.2.4

Die linke Y Achse zeigt den Betrag der Extinktionsänderung, die rechte Y-Achse die FXIII Aktivität in Prozent. Die X-Achse gibt die Zeit in Minuten an. Die volle Aktivität des Standard human Plasmas wurde gleich 100% gesetzt. Der Test wurde bei einer Ca^{2+} Konzentration von 4mM durchgeführt. Das Endprodukt der RFXIII Reinigung wurde zusammen mit Standard human Plasma Lot.502541 und rhu FXIII PDC Lot 008200 untersucht. Während RFXIII seine volle Aktivität schon nach 3min Inkubationszeit erreicht, brauchen das humane Spenderplasma 5min und der rhu FXIII 7min zum Erreichen der vollen Aktivität.

3.3.2.5 Fremdproteinbestimmung

Die Bestimmung von Fremdproteinen wurde mit einem ELISA durchgeführt, der über ein Antiserum gegen den nicht-transfizierten Produktionsorganismus Verunreinigungen durch Hefeproteine erfaßte. Abbauprodukte des RFXIII wurden nicht erkannt. Nach Beendigung des Reinigungsschemas waren noch 1401ng/ml an Fremdprotein nachweisbar. Das entspricht einem Fremdproteinanteil von 0.8% und einer Reinheit des Endproduktes von 99.2%.

3.3.2.6 Bestimmung der nativen Molekulargröße

Die native Molekulargröße wurde mittels HPLC bestimmt (Abb. 24). Nach der HPLC Analyse liefen 83% der Fraktion mit einer Geschwindigkeit (16.337min), die einem Nativ-Molekulargewicht von 94 kd entspricht. Demnach scheint hier RFXIII als Monomer vorzuliegen. Für das native Protein in der Konfiguration α_2 würde ein Molekulargewicht von 165.4 kd (2×82.7 kd) erwartet, für das Monomer dagegen ein Molekulargewicht von 82.7 kd. Zwar fanden sich in der Fraktion in geringeren Anteilen durchaus Peaks, die höheren Molekulargewichten entsprachen, bis zu einer Größe eines Pentamers- dagegen repräsentierten nur etwa 4% der Fraktion ein Molekulargewicht von 179 kd (Retentionszeit: 14.317min), das mit der Größe des nativen Proteins korreliert.

In der HPLC Analyse wurde die Temperatursensitivität von RFXIII gegenüber tiefen Temperaturen deutlich: Nach einmaligem Einfrieren bei -70°C verlor der HPLC Peak, der RFXIII repräsentiert, etwa 10% seines Anteils. Das kleine Chromatogramm in der Abbildung 24 zeigt die Verhältnisse vor dem Einfrieren: Dort hatte der Hauptpeak (bei einer Retentionszeit von 16.33min) einen Anteil von 94.9% an der Gesamtfraktion. Nach dem Einfrieren ist eine Zunahme bei allen Peaks zu verzeichnen, bis auf den Peak bei 94kd, der etwa 10% kleiner ist als vor dem Einfrieren. Vermutlich repräsentieren die anderen Peaks RFXIII Aggregate oder Bruchstücke, während der Peak mit der Retentionszeit 16.33min intaktem RFXIII entspricht.

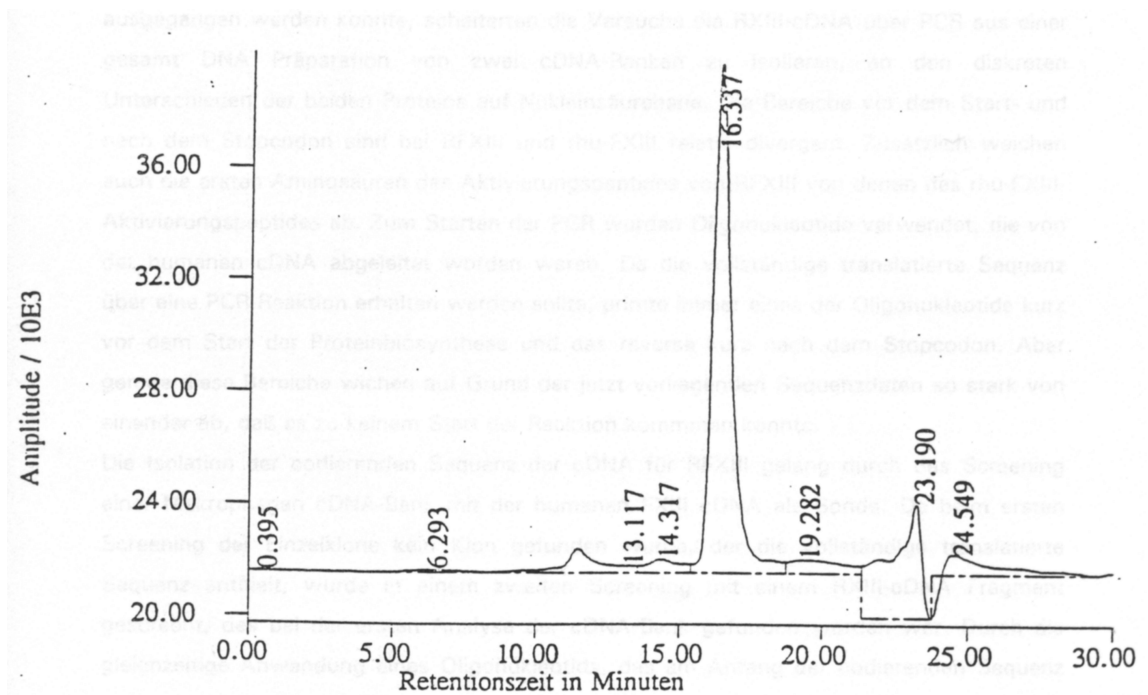
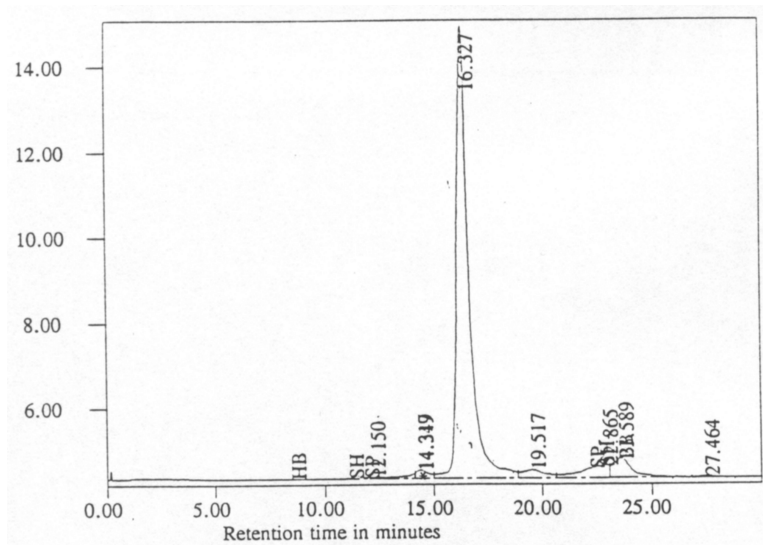


Abbildung 24: HPL Chromatogramm von gereinigtem RFXIII. Die Trennung wurde unter isokratischen Bedingungen mit einer TSK G3000SWXL Säule durchgeführt. Die Flußrate betrug 0.5mL pro Minute bei einem Druck von 30 bar. Das kleine Chromatogramm oben rechts zeigt die Verteilung der Peaks vor dem Einfrieren der Probe.

4. Diskussion

Die Rolle in der Blutgerinnung von FXIII ist lange bekannt. Schon 1948 wurde FXIII als Fibrin stabilisierender Faktor von Laki und Lorand beschrieben. Dagegen wurde über die Rolle in der Wundheilung von FXIII weitgehend spekuliert, da viele in vitro Beobachtungen nicht in vivo nachgewiesen werden konnten. Da ein Tiermodell fehlte, war man darauf angewiesen, sich auf halbquantitative Aussagen aus klinischen Studien zu stützen oder aber tierexperimentelle Studien mit dem humanen Protein durchzuführen (Laohaprasit et al., 1993), wobei xenophobe Reaktionen des Versuchstieres gegen das Medikament die Auswertung erschwerten und diese Modelle auf Patienten schlecht übertragbar waren.

Die Bereitstellung eines animalen FXIII, der es ermöglicht, im homologen System die entsprechenden Untersuchungen durchzuführen, war daher eine interessante Aufgabe.

Obwohl zu Recht von einer großen Homologie zwischen dem RFXIII und rhu-FXIII ausgegangen werden konnte, scheiterten die Versuche die RXIII-cDNA über PCR aus einer gesamt DNA Präparation von zwei cDNA-Banken zu isolieren, an den diskreten Unterschieden der beiden Proteine auf Nukleinsäureebene. Die Bereiche vor dem Start- und nach dem Stopcodon sind bei RFXIII und rhu-FXIII relativ divergent. Zusätzlich weichen auch die ersten Aminosäuren des Aktivierungspeptides von RFXIII von denen des rhu-FXIII-Aktivierungspeptides ab. Zum Starten der PCR wurden Oligonukleotide verwendet, die von der humanen cDNA abgeleitet worden waren. Da die vollständige translatierte Sequenz über eine PCR Reaktion erhalten werden sollte, primte immer eines der Oligonukleotide kurz vor dem Start der Proteinbiosynthese und das reverse kurz nach dem Stopcodon. Aber gerade diese Bereiche wichen auf Grund der jetzt vorliegenden Sequenzdaten so stark von einander ab, daß es zu keinem Start der Reaktion kommen konnte.

Die Isolation der codierenden Sequenz der cDNA für RFXIII gelang durch das Screening einer Makrophagen cDNA-Bank mit der humanen FXIII cDNA als Sonde. Da beim ersten Screening der Einzelklone kein Klon gefunden wurde, der die vollständige translatierte Sequenz enthielt, wurde in einem zweiten Screening mit einem RXIII-cDNA Fragment gescreent, das bei der ersten Analyse der cDNA-Bank gefunden worden war. Durch die gleichzeitige Anwendung eines Oligonukleotids, das am Anfang der codierenden Sequenz primte, konnte ein Klon isoliert werden, der die vollständige translatierte Sequenz enthielt. Nach der Klonierung in den pKS-Vektor wurde der gefundene Klon vollständig durchsequenziert. Die cDNA ist 2784bp lang, wobei der 5' nicht translatierte Bereich nur 39bp lang ist und ein eigenes Startssignal besitzt, das auch in der Position -3 von einem A begleitet wird. Ein A in Position -3 wird als optimal für den Translationsstart angesehen und wiegt negative Effekte auf, die von der Umgebung des

ersten ATG ausgehen können (Kozak, 1986). Die rhu-FXIII cDNA, besitzt vor dem Translationsstart noch 85bp und auch das dominante A in Position -3 (Grundmann et al., 1986). Für beide cDNAs-rhuFXIII und RFXIII ist das A in Position -3 von außerordentlicher Bedeutung, da die erste Aminosäure nach dem Translationsstart ein Serin ist. Dadurch muß in Position +4 ein T stehen, was für die Translationsinitiation eher nachteilig ist (Kozak, 1986). Nach 2238bp ist das Stopcodon (TAA) erreicht, während bei der humanen FXIII cDNA das Translationsende erst bei Position 2283 erreicht ist. Dieser Unterschied läßt sich aber zwanglos durch die unterschiedlich langen 5' flankierenden Bereiche erklären. Im Fall der RXIII-cDNA bleiben nur 546bp als 3' flankierende Region übrig, während bei der humanen FXIII cDNA nach dem Stopcodon noch 1533 nicht translatierte bp bleiben. Im 3' nicht translatierten Bereich fehlt dem Klon das poly-A-Ende, allerdings findet sich 232bp nach dem Stopcodon eine Consensussequenz AATTAA, die nicht nur einmal, sondern gleich viermal in unregelmäßigen Abständen in den folgenden 316bp zu finden ist. Stets wird die AATTAA Sequenz von einem CA begleitet, aber nur einmal von CA- und GT-Cluster. In den meisten Fällen wird AATAAA als Polyadenilierungssignal angesehen (Proudfoot, Brownlee, 1976), das relativ nah(20 bis 30bp upstream) am poly-A zu finden ist. Da hier das poly-A fehlt, läßt sich nicht eindeutig klären, ob die gefundene Sequenz als Signal dient oder nicht. Jedoch nennen Birnstiel et al., 1985 und Nonaka et al., 1993 auch AATTAA als natürlich vorkommendes Polyadenylierungssignal..

Die Sequenz ergibt auf Proteinebene eine 93%ige Homologie zum humanen FXIII, auf Nukleinsäureebene eine Identität der Sequenzen von 82%. Die Sequenz- ohne den Initiator Methionin- codiert für 731 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 82.543 kd und entspricht damit der cDNA des humanen FXIII, die ebenfalls für 731 Aminosäuren codiert mit einem Molekulargewicht von 82.996 (Grundmann et al. 1986). Die Domänen der beiden Proteine unterscheiden sich nicht hinsichtlich der Aminosäuresequenz. Auch besitzen beide Proteine identische Motive in ihrer Aminosäuresequenz, die als Glykolsylierungsstellen angesehen werden könnten (Vgl unter 3.2.3). Anhand der oben genannten Sequenzdaten scheint die a-Untereinheit evolutionär stark konserviert zu sein, während die b-Untereinheit einen geringeren Grad der Konservierung vermuten läßt, da hier die Homologie auf Aminosäureebene zwischen Mensch und Maus nur 77.5% beträgt (Nonaka et al., 1993). Selbst die Aktivierungspeptide von FXIII aus unterschiedlichen Säugern differieren doch auffallend (s.u.). Obwohl der menschliche FXIII auf Aminosäureebene mit dem gleichen Protein aus der Ratte zu 93% identisch ist, stimmen die Aktivierungspeptide nur zu 73% überein. Das Aktivierungspeptid von FXIII aus dem Rind ist allerdings zu 86% mit dem menschlichen Protein identisch. Die Aktivierungspeptide von Ratte und Rind sind nur zu 70% homolog. Auffallend bei dem Vergleich der Aktivierungspeptide ist weiterhin, daß trotz der Unterschiede, den die

Andere Arbeiten an unterschiedlichen Transglutaminasen (zum Überblick: Tabelle 10) haben gezeigt, daß selbst unter Säugetieren eine so hohe Identität von homologen Proteinen -wie sie beim humanen FXIII und dem entsprechenden Protein aus der Ratte vorliegen- ungewöhnlich ist. So stimmen beispielsweise eine menschliche Prostata-Transglutaminase mit der Prostata-Transglutaminase aus der Ratte nur zu 51% überein (Grant et al 1994). Dagegen sind die Transglutaminasen Typ I aus Kaninchen und Ratte zu 92% mit der menschlichen identisch (Saunders et al 1993, Phillips et al 1990):

Tabelle 10: Vergleich von unterschiedlichen Transglutaminasen hinsichtlich ihrer Homologie (Aminosäureebene). TG= Transglutaminase (TypI bzw. TypII), M=Makrophagen, P=Prostata, GPL=Guinea Pig Liver, B4.2= Bande 4.2 , *kursive Schreibweise*: Referenz.

| | humaner FXIIIa | humaner FXIIIb | humanes B4.2 | GPL TG | humane TGII | murine M TG | humane TGI | ratten P TG |
|---|-------------------|-------------------|-----------------|-----------|----------------|----------------|---------------|----------------|
| FXIIIa (Ratte) <i>diese Arbeit</i> | 93% | | | | | | | |
| FXIIIb (murin) <i>Nonaka et al</i> <i>1993</i> | | 77,5% | | | | | | |
| Erythrocyten TG (Huhn) <i>Weraarchakul</i> <i>-Boonmark et</i> <i>al., 1992</i> | 36.1% | | 33.6% | 60.2% | 64% | 62.9% | | |
| TGI (Kaninchen) <i>Saunders et</i> <i>al 1993</i> | | | | | | | 92% | |
| TG aus Prostata cDNA Biblio- thek (human) <i>Grant et al</i> <i>1994</i> | | | | | | | | 51% |
| TGI Ratte | | | | | | | 92% | |
| TGI (human) <i>Phillips et al</i> <i>1990</i> | 45% | | 29% | 37% | | | | |

Bei der Suche nach einem optimalen Expressionssystem für das rekombinante Protein müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden: Bei der Expression in Säugerzellen treten weniger Schwierigkeiten bei der Faltung und Glykolsylierung eines rekombinanten Säugerproteins auf, als es bei der Expression in *E. coli* oder auch in Hefe der Fall ist. Auch können gute Produktionsleistungen mit Säugerzellen erzielt werden: So können mit dem SV40 als Vektor Expressionsraten von $1\text{-}10\mu\text{g}/1\times 10^6$ Zellen erreicht werden und auch der Heat shock-Promotor ist als Expressionssystem gut geeignet, da auch in diesem System Expressionsraten von $1\mu\text{g}/1\times 10^6$ Zellen erreicht werden können. Trotzdem bleibt die Expressionsrate bezogen auf das Kulturvolumen relativ gering: Durch die geringen Zelldichten die in der Kultur von Säugerzellen erreicht werden, liegt die Produktionsrate an rekombinatem Protein pro mL zwischen $0.01\text{-}10\mu\text{g}$, je nach Zelllinie und verwendetem Vektor (Kaufman, 1990). Durch die höheren Organismendichten, die in der Hefekultur erreicht werden können, ist es recht einfach, Expressionsraten von $5\text{-}50\mu\text{g/mL}$ Kulturvolumen zu erzielen, obwohl hier die Expressionsrate bezogen auf die Zellzahl deutlich schlechter ist; bestenfalls wurden in der vorliegenden Arbeit $0.4\mu\text{g}$ rekombinates Protein/ 1×10^6 Zellen produziert.

Während der Fermentation bleibt das rekombinante Protein dem Milieu des Gastorganismus ausgesetzt und muß unter diesen Bedingungen stabil bleiben. Zudem besitzt *Saccharomyces cerevisiae* zahlreiche intrazellulär aktive Proteasen, die während der stationären Phase der Fermentation, also der Produktionsphase des rekombinanten Proteins, produziert werden (Shuster, 1989). Also war es wichtig, nach einem Hefestamm zu suchen, der an Proteasen defizient ist. So läßt sich nicht nur die Produktion von rekombinantem Protein steigern, sondern es lassen sich auch Schwierigkeiten bei der Proteinreinigung vermeiden, da man auf den Einsatz problematischer Protease-Inhibitoren verzichten kann. Bei ausreichender Stabilität des Produktes lassen sich sogar viele Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchführen. *Saccharomyces cerevisiae* CL3ABYS86 erfüllt diese Anforderungen gut. Der Stamm ist defizient an einer Reihe von Proteasen (*pra1*, *prb1*, *prc1*, *cps1*) und läßt sich schon in der Schüttelkultur zu hohen Organismendichten (1×10^8 Zellen pro mL Kultur) anziehen. Da FXIII zudem nicht glykolisiert wird (Takahashi et al 1986), und aufgrund der großen Übereinstimmungen der beiden Proteine dasselbe für RFXIII anzunehmen war, waren die groben Voraussetzungen für eine Fermentation in Hefe erfüllt. Es hätte auch die Möglichkeit bestanden im homologen System zu exprimieren, aber die Expression in Hefe wurde -auch aufgrund bestehender Erfahrungen mit dem rhu FXIII- vorgezogen. Obwohl es Literaturangaben gibt, daß es möglich sei FXIII sekretorisch zu produzieren (Tharaud et al., 1992), wurde hier intracellulär exprimiert, da die

Expressionsleistung der sekretorischen Systeme mit 500ng/ml Kulturvolumen knapp über der Nachweisgrenze liegt.

Bei der Konstruktion der Expressionsvektoren wurde ein optimales Vektor/Host-System gesucht. Um ein optimales Vektor/Host-System zu erhalten, muß der Vektor in möglichst hoher Kopienzahl vorliegen. Zusätzlich muß der Vektor auch ohne Selektionsdruck in den Zellen persistieren, um bei der Fermentation die Wachstumsphase der Kultur von der Produktionsphase trennen zu können, da möglicherweise das rekombinante Protein für den Wirtorganismus toxisch ist oder es während einer kontinuierlichen Produktion des rekombinanten Proteins zu einer Konkurrenz zwischen rekombinantem Protein und dem zelleigenen Stoffwechsel um die für Transkription und Translation benötigten Kofaktoren kommen kann. Das hätte eine geringe Produktion des heterologen Proteins zur Folge. Die transformierte Zelle gerät unter selektiven Wachstumsbedingungen in einen Konflikt: Die Wachstumsrate ist abhängig von dem LEU2/URA3 Genprodukt. Deshalb führt eine hohe Kopienzahl des Vektors zu besseren Wachstumsbedingungen. Andererseits führt eine hohe Kopienzahl des Vektors zu vermehrter Produktion des rekombinanten Proteins und damit im Gegenzug zu einer proportional zur Produktionsleistung verringerten Wachstumsrate (Hinnen et al 1989).

Die verwendeten Vektoren waren Hefe-E.coli-shuttle-Vektoren, die eine gute Vermehrung der Plasmid-DNA in E.coli erlaubten und gleichzeitig für die Expression in dem Expressionsorganismus geeignet waren. Sie waren über die Kohlenstoffquelle induzierbar (s.u.) und basierten auf dem endogenen 2 μ Plasmid, das in hoher Kopienzahl von etwa 100 Kopien pro haploidem Genom (Armstrong et al., 1989) in der Hefe vorkommt. Durch die Verwendung des 2 μ Plasmids als Grundlage eines Expressionsvektors kann eine hohe Gendosis des heterologen Gens erzielt werden. Gleichzeitig wird eine gute Stabilität des Vektors erreicht, da das 2 μ Plasmid einen eigenen Mechanismus zur Verteilung der Tochterplasmide während der Mitose besitzt. Gesteuert wird die Verteilung von zwei plasmideigenen Genprodukten REP1 und REP2. Zusätzlich wird ein Genprodukt STB benötigt. Der genaue Verteilungsmechanismus ist allerdings noch ungeklärt. (Wu et al., 1987)

Bei der Konstruktion der Expressionsvektoren wurden zwei verschiedene Promotoren (GAL/CYC, ADHI), sowie zwei unterschiedliche Versionen der cDNA an den Wirtszellen getestet. Es wurden Promotoren gewählt, die sich über die Kohlenstoffquelle induzieren lassen: Der GAL-CYC1-Promotor ist ein Hybridpromotor der einerseits die upstream activation site

(UAS_G) der Hefe-Galactokinase (GAL 1) und der Hefe-Epimerase (GAL 10) besitzt und andererseits den 5' nichttranslatierten leader des Cytochrom c (CYC1)-Gens. Beide Promotorelemente werden in Anwesenheit von Glucose reprimiert, das UAS_G Element sorgt für die Induzierbarkeit des Promotors durch die Fütterung von Galaktose.

Der ADHII-Promotor ist dagegen selbstinduzierend: Nach dem Verbrauch der im Medium vorhandenen Glucose, wird der Promotor induziert. Das verwendete Vektor/Host System ist optimal für die Produktion des RFXIII in Hefe geeignet: Die Vektoren können ohne Selektionsdruck in der Zelle persistieren, da sie auf dem endogenen 2µ Plasmid basieren. Außerdem sind sie induzierbar und lassen damit eine Trennung von Wachstumsphase der Kultur und Produktionsphase des heterologen Proteins zu. Der Wirtsorganismus läßt sich zu hohen Organismendichten anziehen und ist gleichzeitig defizient an einigen wichtigen Proteasen (s.o.). So konnten Wachstumsphase und Produktionsphase wirksam voneinander getrennt und eine gute Stabilität des Produktes erzielt werden.

Die cDNA Konstrukte bestanden in einer am 3' Ende um 468 bp verkürzten und einer unverkürzten Version, da es Beobachtungen gab, aus denen hervorging, daß eine Verkürzung des 3' nichttranslatierten Endes der cDNA die Expressionsleistung um das 100-fache steigern kann (Bröker et al., 1991, Bishop et al 1990). Bei der vorliegenden RXIII-cDNA erbrachte die Verkürzung am 3' nichttranslatierten Ende keine Expressionssteigerung. Dadurch, daß die 3' flankierende Region der RXIII-cDNA nur 1/3 der Länge der rhu-FXIII cDNA besitzt, ist es zu erklären, daß sich bei der Expression der cDNA in seinem Wirtsorganismus, die Verkürzung der cDNA im 3' Bereich nicht so entscheidend auf die Produktionsleistung der Klonen auswirkte, während eine entsprechende 3' Verkürzung der cDNA im Falle des humanen FXIII eine deutliche Verbesserung der Produktionsleistung ergeben hat.

Wie von der Aminosäuresequenz anzunehmen war, bestanden zwischen RFXIII und rhu-FXIII große Ähnlichkeiten, die während der Proteinreinigung und -charakterisierung unterstrichen wurden. Die diskreten Unterschiede der beiden Proteine machten es aber unmöglich, das Reinigungsverfahren des humanen FXIII einfach zu übernehmen.

Das rekombinante Protein wurde mit klassischen Proteinreinigungsverfahren gereinigt, da es möglich sein sollte, nach einem up-scaling der Labormethoden Endproduktmengen von einigen 100 Milligramm zu produzieren. Da das Endprodukt nicht nur hochrein, sondern auch biologisch voll aktiv vorliegen sollte, schied ein Reinigungsverfahren über Antikörpersäulen aus. So

wurden zwei Ionenaustauschersäulen und zwei Fällungsschritte miteinander kombiniert, wobei darauf geachtet wurde, daß ein Ankonzentrieren und Dialysieren der einzelnen Reinigungsstufen wegfiel. Die letzte Reinigungsstufe war ein Molekularsieb, das dazu diente, RFXIII-Bruchstücke, die während der Reinigung entstanden, abzutrennen. Die wesentlichen Unterschiede zum rhu-FXIII fanden sich in zwei Schritten des Reinigungsschemas: Zum einen wurde bei der DEAE-Chromatographie eine höhere Salzkonzentration als beim humanen FXIII benötigt, um das Protein von der Säule zu eluieren, zum anderen mußte die Dialyse am isoelektrischen Punkt bei einem anderen pH-Wert durchgeführt werden. Beide Ergebnisse haben ihre Begründung in dem deutlich vom rhu-FXIII verschiedenen isoelektrischen Punkt: Da der RFXIII seinen IP im wesentlich saureren Bereich (5.42) hat als der rhu-FXIII (6.2) band er unter den Chromatographiebedingungen auch wesentlich fester an den Anionenaustauscher und war erst bei einer größeren Salzkonzentration von der Säule zu eluieren.

Für den humanen FXIII gibt es Daten (Takahashi et al., 1986), nach denen das Protein nicht glykolisiert wird. Auch für den RFXIII darf angenommen werden, daß das Protein nicht glykolisiert wird, da errechnetes Molekulargewicht (82.5kd) und im SDS-Gel gefundenes Molekulargewicht (82.8kd) gut übereinstimmen. Im Falle einer Glykolsylierung von RFXIII hätte man ein höheres Molekulargewicht als das errechnete im SDS Gel erwartet.

Im Westernblot wurde die große Ähnlichkeit der beiden Proteine deutlich: RFXIII ließ sich mit einem monoklonalen Antikörper gegen rhu-FXIII anfärben. Der RFXIII ließ sich in den Reinigungsschritten bis nach der HIC im Westernblot als Doppelbande darstellen. Nach der Fällung am isoelektrischen Punkt sieht man nur noch eine Bande im Westernblot. Da die Doppelbande sich mit dem monoklonalen Antikörper genauso gut anfärben läßt wie die einzelne Bande und zusätzlich im Aufschluß von nicht transfizierten Hefezellen nicht zu finden ist, liegt der Schluß nahe, daß es sich bei der Doppelbande einmal um RFXIII mit und das andere Mal ohne Aktivierungspeptid handelt. Außerdem differieren die beiden RFXIII Banden um etwa 4kd, um die Größe des Aktivierungspeptides. Bishop et al 1990 konnten zeigen, daß sich voll aktivierter FXIII und FXIII mit Aktivierungspeptid im SDS-Gel unterscheiden lassen.

Lorand et al 1981 und Polgar et al., 1990 beschreiben eine nicht proteolytische Aktivierung von FXIII in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (0.1M für Ca^{++}). Plausibel wird diese nicht proteolytische Aktivierung durch die Beobachtungen, die Yee et al 1994 an der räumlichen Struktur von rhu-FXIII machten: Das Aktivierungspeptid der einen Untereinheit liegt im aktiven Zentrum der anderen Untereinheit und umgekehrt. So wird eine Substratbindung verhindert.

Das Aktivierungspeptid wird über fünf Wasserstoffbrücken in seiner Position gehalten. Da von mehreren Autoren (Lorand et al., 1981, Polgar et al 1990 Muszbek et al 1993) angenommen wird, daß während der Aktivierung FXIII eine Konformationsänderung erfährt, während der das aktive Zentrum demaskiert wird, liegt die Vermutung nahe, daß die hohen Salzkonzentrationen, die verwendet werden mußten, um die Trennungen durchführen zu können, möglicherweise eine Konformationsänderung bei dem Protein bewirkte und dadurch den Zugriff einiger Hefeproteasen erlaubte. Da sich in der Literatur Hinweise finden, daß auch andere Proteasen (Bromelain, Trypsin, Nakamura et al 1975; Calapain I, Muszbek et al 1993) in vitro das Aktivierungspeptid von FXIII abspalten können, ist es denkbar, daß unter nicht physiologischen Bedingungen auch Hefeproteasen die Abspaltung des Aktivierungspeptides übernehmen.

Die Nativ-Elektrophorese zeigte Unterschiede zwischen RFXIII und rhu-FXIII auf, da das Rattenprotein näher zur Anode orientiert blieb als sein humanes Pendant. Die beiden Proteine unterscheiden sich etwas in ihrer spezifischen Aktivität- der rhu-FXIII hat eine spezifische Aktivität von etwa 200E/mg (H. Metzner, pers. Mitteilung), während der RFXIII nur auf etwa 115E/mg kommt, Dieser geringe Unterschied dürfte in vivo nicht von Belang sein, da die Ratte fast doppelt soviel (1.98E bzw. 17µg) FXIII pro mL Blut besitzt wie der Mensch (1E bzw 10µg; Karges et al 1994).

Auch die Aktivierungsgeschwindigkeit, die sich am Endprodukt gut im Berichromtest® verfolgen ließ, unterscheidet sich etwas vom rhu-FXIII: Während das Rattenprotein schon nach 3min voll aktiv war, brauchte das rekombinante humane Protein 7min zum Erreichen seiner vollen Aktivität, und das humane Spenderplasma, das als Referenz in jedem Test eingesetzt wurde, war nach 5min voll aktiv. Bishop et al 1990 beschreiben eine Aktivierung von rekombinantem humanen FXIII nach nur drei Minuten. Die gefundenen Unterschiede in der Aktivierung mögen sich darauf gründen, daß von den oben genannten Autoren ein anderer Assay benutzt wurde.

Die native Molekulargröße ergab, daß der RFXIII unter den gewählten Chromatographiebedingungen als Monomer lief, während der rhuFXIII unter ähnlichen Bedingungen sich verhielt wie das Isolat aus Plazenta (Metzner et al., 1991). Radek et al 1993 fanden allerdings unter ähnlichen Chromatographiebedingungen wie in der vorliegenden Arbeit auch ein Laufverhalten von rhu-FXIII, das nicht eindeutig einem Dimer entsprach, obwohl die Autoren zeigen konnten, daß ihr Protein sich mit der b-Untereinheit assoziieren kann.

Sowohl der humane FXIII und der RFXIII sind sensibel gegenüber tiefen Temperaturen. Nach einmaligem Einfrieren bei -70° C repräsentiert der Hauptpeak in der HPLC einen um 10%

geringeren Anteil von RFXIII. Diese Temperatursensibilität hat er mit rhu-FXIII und anderen Transglutaminasen gemeinsam.

Die anfangs (vgl.:1.3) gestellten Fragen lassen sich jetzt zusammenfassend beantworten:

1. rhu-FXIII und RFXIII sind zu 93% in ihrer Aminosäurezusammensetzung identisch. Aufgrund der Basensequenz lassen sich nur von einander verschiedene isoelektrische Punkte erwarten.
2. Es bestehen geringfügige funktionelle Unterschiede: RFXIII lässt sich schneller (nach 3min) als rhu FXIII aktivieren und hat eine geringere spezifische Aktivität ($1E \approx 8.7 \mu\text{gProtein}$) als rhu FXIII. Die etablierten Testmethoden lassen sich allerdings auf den RFXIII problemlos übertragen.

5. Zusammenfassung:

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Projektes der Behringwerke fertiggestellt, das die Rolle des Faktor XIII (FXIII) in der Wundheilung aufklären soll. Hierzu existieren geeignete Modelle in der Ratte zur Untersuchung der Heilung von Schnitt- und Stanzwunden.

Ziel der Arbeit war es, den FXIII der Ratte (RFXIII) rekombinant herzustellen, um zum einen positive Effekte, welche mit humanem FXIII in Rattenmodellen erhalten wurden, mit dem homologen Enzym zu bestätigen und zum anderen RFXIII spezifische Antikörper zu gewinnen. Diese Antikörper sollen in der Ratte zur Absenkung des endogenen RFXIII Plasmalevels verwendet werden, um einen Zusammenhang zwischen FXIII-Plasmakonzentration und der Wundheilungsgeschwindigkeit zu überprüfen.

Die RXIII-cDNA wurde durch das Screening einer Ratten-Makrophagen cDNA-Bank isoliert. Sie wurde mit drei unterschiedlichen Sonden identifiziert: 1. mit der humanen FXIII cDNA, 2. mit einem im Screening erhaltenen Fragment der RXIII-cDNA und 3. mit einem synthetischen Oligonukleotid, welches in der PCR zu positiven Signalen mit der cDNA aus der Bank geführt hatte.

Nach der Identifizierung des Klons wurde er in KS⁻ kloniert und vollständig sequenziert. Die cDNA war 2784bp lang. Sie hatte einen offenen Leserahmen von 2192bp. Das 5' nicht translatierte Ende war 39bp lang, das 3' nichttranslatierte Ende verfügte über 549bp, dem ein poly A-tail fehlte. Die cDNA codierte für ein Protein von 731 Aminosäuren und einem theoretischen Molekulargewicht von 82.7kDa. Es war zu 93% zu rhu-FXIII homolog. Erwartungsgemäß unterschieden sich beide Proteine nicht in ihren Domänen: Thrombinspaltstellen, Ca²⁺ Bindungsstellen und das aktive Zentrum waren identisch.

Exprimiert wurde der RFXIII intrazellulär in *Saccharomyces cerevisiae* unter der Kontrolle des Gal/Cycl-Hybridpromotor. Der Klon, der für die Fermentation verwendet wurde, exprimierte 44µg rekombinantes Protein/ml Kulturvolumen.

RFXIII wurde nach dem Aufbruch der Hefezellen gereinigt. Die Reinigungsschritte umfaßten eine Ultrazentrifugation, eine Ionenaustauschchromatographie, eine Ammonium-sulfatfällung, eine hydrophobe Interaktionschromatographie, eine Fällung am isoelektrischen Punkt und eine Gelchromatographie. Das Ende des Reinigungsschemas ergab ein homogenes Enzym nach SDS-Gelelektrophorese mit einem Fremdproteinanteil von 8000 ppm mit einer Ausbeute von

2% und einer 1250-fachen Anreicherung. Das gereinigte Enzym hatte ein Molekulargewicht von 82.8kDa, einen isoelektrischen Punkt von 5.4 und eine spezifische Aktivität von 115E/mg.

Damit steht ein rekombinanter FXIII aus der Ratte zur Verfügung, der sich sowohl für die Wundheilungsexperimente in vivo, als auch für die Herstellung von neutralisierenden Antikörpern eignet.

6. Literaturverzeichnis:

Aeschilman, D., Paulsson, M. (1994)

Transglutaminases: Protein Cross-Linking Enzymes in Tissues and Body Fluids
Thrombosis and Haemostasis, 71:402-415

Armstrong, K.A., Som, T., Volkert, F.C., Rose, A., Broach, J.R., (1989)

Propagation and expression of genes in yeast using a 2-micron circle vectors
Biotechnology 13: 165-192

Barry, E., L., R., Mosher, D., F. (1989)

Factor XIIIa-mediated Cross-linking of Fibronectin in Fibroblast Cell Layers
The Journal of Biological Chemistry, 264: 4179-4185

Birnstiel, M., L., Busslinger, M, Straub, K. (1985)

Transcription Termination and 3' Processing: The End Is in Site!
Cell, 41: 349-359

Bishop, P., D., Teller, D., C., Smith, R., A., Lasser, G., W., Gilbert, T., Seale, R., L. (1990)

Expression, Purification, and Characterisation of Human Factor XIII in *Saccharomyces cerevisiae*
Biochemistry, 29:1861-1869

Board, P., Coggan, M., Miloszewski, K., (1992)

Identification of a Point Mutation in Factor XIII A Subunit Deficiency
Blood, 80: 937-941

Board, P., G., Reid, M., Serjeantson, S. (1984)

The gene for coagulation factor XIII a subunit (F13A) is distal to HLA on chromosome 6.
Human Genetics, 67:406-408

Board, P., G., Webb, G., C., McKee, J., Ichinose, A. (1988)

Localisation of the coagulation factor XIIIa subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24-p25.
Cytogenetics and Cell Genetics, 48: 25-27

Bottenus, R., E., Ichinose, A., Davie, E., W. (1990)

Nucleotid Sequence of the Gene for the b subunit of Human Factor XIII

Biochemistry, 29: 11195-11209

Bröker, M., Bäuml, O., Göttig, A., Ochs, J., Bodenbender, M., Aman, E. (1991)

Expression of the human blood coagulation protein FXIIIa in *Saccharomyces cerevisiae*: dependence of the expression levels from host-vektor systems and medium condititons

Applied Microbiology and Biotechnology, 34: 756-764

Cesareni, G., Murray, J., A., H. (1987)

Plasmid Vectors Carrying The Replication Origin Of Filamentous Single-Stranded Phages

In: Genetic Engineering, 9

Setlow, J., K. (ed)

(Plenum Publishing Corporation)

pp: 135-154

Chen, R., Doolittle, R., F. (1971)

γ - γ Cross-linking Sites in Human and Bovine Fibrin

Biochemistry, 10: 4486-4491

Egbring, R., Seitz, R., Gürten, G., V., Köther, M., Barthels, M., Fuchs, G., Lerch, L., A., Kröninger, A. (1988)

Bleeding Complications in Heterozygotes with Congenital Factor XIII Deficiency

In: Fibrinogen 3

Biochemistry, biological functions, gene regulation and expression

Mosesson, M. W. et al (eds)

pp: 341-346

Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division)

Fickenscher, K., Aab, A., Stüber, W. (1991)

A Photometric Assay for Blood Coagulation Factor XIII

Thrombosis and Haemostasis, 65: 535-540

Fink, M., L., Chung, S., I., Folk, J., E., (1980)

γ -Glutamylamine cyclotransferase: Specificity toward ϵ -(L- γ -glutamyl)-L-lysine and related compounds.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 77: 4564-4568

Forth, W., Henschler, D., Rummel, W.,

Pharmakologie und Toxikologie

5. Auflage 1987

Wissenschaftsverlag Mannheim/Wien/Zürich

Grant, F., J., Taylor, D., A., Sheppard, P., O., Mathews, S., L., Lint, W., Vanaja, E., Bishop, P., D., O'Hara, P., J., (1994)

Molecular Cloning of a Novel Transglutaminase cDNA From a Human Prostate Library

Biochemical and Biophysical Research Communications, 203: 1117-1123

Grundmann, U., Amann, E., Zettlmeissl, G., Küpper, H., A. (1986)

Charakterisation of cDNA coding for human factor XIIIa

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 83: 8024-8028

Hada, M., Kaminski, M., Bockenstedt, P., McDonagh, J. (1986)

Covalent Crosslinking of von Willebrand Factor to Fibrin

Blood, 68: 95-101

Heins, M., Fahron, U., Wthold, W., Rick, W. (1994)

Optimization of a New Continuous UV Assay for the Determination of Blood Coagulation Factor XIII Activity in Human Plasma

European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 32:479-483

Hettasch, J., M., Greenberg, C., S. (1994)

Analysis of the Catalytic Activity of Human Factor XIIIa by Site-directed Mutagenesis

The Journal of Biological Chemistry, 269: 28309-28313

Hinnen, A., Meyhack, B., Heim, J., (1989)

Heterologous Gene Expression in Yeast

Biotechnology 13: 193-213

Hornyak, T, J., Shafer, J., A. (1992)

Interactions of Factor XIII with Fibrin as Substrate and Cofactor
Biochemistry, 31: 423-429

Hubbard, C., S., Ivatt, R., J. (1981)

Synthesis and Processing of Asparagine-linked Oligosaccharides
Annual Review Biochemistry, 50: 555-583

Ichinose, A., McMullen, B., A., Fujikawa, K., Davie, E., W. (1986)

Amino Acid Sequence of the b Subunit of Human Factor XIII, a Protein Composed of Ten Repetitive Segments
Biochemistry, 25: 4633-4638

Ichinose, A., Davie, E., W. (1988)

Characterisation of the Gene for the a subunit of human FXIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 85: 5829-5833

Kamura, T., Okamura, T., Murakawa, M., Tsuda, H., Teshima, T., Shibuya, T., Harada, M., Niho, Y. (1992)

Deficiency of Coagulation Factor XIII A Subunit Caused by the Dinukleotide Deletion at the 5' End of Exon III
Journal of Clinical Investigation, 90: 315-319

Karges, H., E., Funk, K., A., Ronneberger, H. (1994)

Activity of Coagulation and Fibrinolysis Parameters in Animals
Arzneimittel-Forschung, 44: 793-797

Kaufman, R., J. (1990)

Vectors used for expression in Mammalian Cells
Methodes In Enzymology,
Volume 185, chapter 39: 487-511
Academic press, Inc.

Kozak, M (1986)

Point Mutations Define a Sequence Flanking the AUG Initiator Codon That Modulates Translation By Eukaryotik Ribosomes
Cell, 44: 283-292

Laemmli, U., K.. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature, 227: 680-685

Lai, T.-S., Achyuthan, K., E., Santiago, M., E., Greenberg, C., S., (1994)

Carboxy-terminal Truncation of Recombinant Factor XIII A-chains: Characterisation of Minimum Structural Requirement For Transglutaminase Activity
The Journal of Biological Chemistry, 269: 24596-24601

Laohaprasit, V., Edwards, M., W., Mayberg, M., R., (1993)

Prevention of Postoperative Intracerebral Hemorrhage with Topical Recombinant FXIII in the Rat
Neurosurgery, 32: 630-634

Laki, K., Lorand, L (1948)

On the solubility of fibrin clots
Science, 108:280

Lorand, L., Credo, R., B., Janus, T., J., (1981)

Factor XIII (Fibrin -Stabilising Factor)
In: Methods in Enzymology, 80: 333-341
Academic Press, Inc.

Lukacova, D., Matsueda, G., R., Haber, E., Reed, G., L. (1991)

Inhibition of Factor XIII Activation by an Anti-Peptide Monoclonal Antibody
Biochemistry, 30: 10164-10170

Mary, A., Achyuthan, K., E., Greenberg, C., E. (1987)

Factor XIII Binds to the Aa and Bb Chains in the D-Domain of Fibrinogen: An Immunoblotting Study

Biochemical and Biophysical Research Communications, 147:608-614

Mary, A., Achyuthan, K., E., Greenberg, C., E. (1988)

The binding of divalent metal ions to platelet factor XIII modulates its proteolysis by trypsin and thrombin

Archives of Biochemistry and Biophysics, 261: 112-121

Metzner, H., J., Funk, K., Panzer, U., Pâques, E.-P. (1991)

Recombinant factor XIII-biochemical properties

In: Factor XIII

Second International Conference Marburg, 1991

McDonagh, J., Seitz, R., Egbring, R. (Eds.)

Stuttgart; New York: Schattauer (1993), pp.: 87-93

McDonagh, J. (1991)

Biochemistry of Fibrin- Stabilising Factor (FXIII)

In: Factor XIII

Second International Conference Marburg, 1991

McDonagh, J., Seitz, R., Egbring, R. (Eds.)

Stuttgart; New York: Schattauer (1993), pp.: 2-8

Muszbek, L., Polgar, J., Boda, Z., 1993

Platelet Faktor XIII Becomes Active without the Release of Activation Peptide during Platelet Activation

Thrombosis and Haemostasis, 69: 282-285

Nakamura, S., Iwanga, S., Suzuki, T., (1974)

Amino Acid Sequence of the Peptide Released from Bovine Factor XIII Following Activation By Thrombin

Biochemical and Biophysical Research Communications, 58: 250-256

Nakamura, S., Iwanga, S., Suzuki, T., (1975)

On the Activation of Bovine Plasma Factor XIII

Journal of Biochemistry, 78: 1247-1266

Nonaka, M., Matsuda, Y., Shiroishi, T., Moriwaki, K., Nonaka, M., Natsuume-Saki, S., (1993)

Molecular Cloning of the b Subunit of Mouse Coagulation Factor XIII and Assignment of the Gen to Chromosome 1: Close Evolutionary Relationship to Complement Faktor H

Genomics, 15: 535-542

Olaisen, B., Gedde-Dahl, T., Jr., Teisberg, P., Throsby, E., Siverts, A., Jonassen, R., Wilhelmy, M., C., (1985)

A structural locus for cogulation factor XIIIa (F13A) is located distal to the HLA region on chromosome 6p in man.

American Journal of Human Genetics, 35:215-220

Phillips, M., A., Stewart, B., E., Qin, Q., Chakravarty, R., Floyd, E., E., Jetten, A., M., Rice, R., H., (1990)

Primary strukture of kerationcyte transglutaminase

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 87: 9333-9337

Polgar, J., Hidasi, V., Muszbek, L. (1990)

Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage Factor XIII)

Biochemical Journal, 267: 557-560

Proudfoot, N., J., Brownlee, G., G. (1976)

3' Non coding region sequences in eukaryotic messenger RNA

Nature, 263: 212-214

Radek, J., T., Jeong, J.-M., Wilson, J., Lorand, L. (1993)

Association of the A Subunits of Recombinant Placental Factor XIII with the Native Carrier B subunits from Human Plasma.

Biochemistry, 32: 3527-3534

Rodeghiero, F., Castaman, G., C., Di Bona, E., Ruggeri, M., Dini, E. (1987)

Successful Pregnancy in a Woman With Congenital Factor XIII Deficiency Treated With Substitutive Therapy
Blut, 55: 45-48

Rüther, U. (1982)

pUR 250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts
Nucleic Acid Research, 10: 5765-5771

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989)

Molecular cloning - a laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory,
Cold Spring Harbor, New York

Sanger, F., Nickeln, S., Coulson, A., R. (1977)

DNA Sequencing with chain terminating inhibitors
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 74: 5463-5467

Saunders, N., A., Bernacki, S., H., Vollberg, T., M., Jetten, A., M., (1993)

Regulation of Transglutaminase Type I Expression in Squamous Differentiating Rabbit Tracheal Epithelial Cells and human Epidermal Keratinocytes: Effects of Retinoic Acid and Phorbol Esters
Molecular Endocrinology, 7: 387-398

Sherman, F., Fink, G., R., Hicks, J., B., (1983)

Methods in yeast genetics
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Shuster, J., R. (1989)

Regulated Transcriptional Systems for the Production of Proteins in Yeast:
Regulation by Carbon Source
Biotechnology 13: 83-108

Singer, M., A., Hortsch, M., Goodman, C., S., Bently, D., (1992)

Annulin , a Protein expressed at limb segment boundaries in the grasshopper embryo, is homologous to protein cross-linking transglutaminases
Developmental Biology, 154: 143-159

Takahshi,N., Takahshi,Y., Putnam, F., W. (1986)

Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinolygase, transglutaminase) from human placenta
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 83: 8019-8023

Tamaki, T., Aoki, N., (1982)

Cross-linking of α_2 -Plasmin Inhibitor to Fibrin Catalysed by Activated Fibrin-stabilizing Factor
The The Journal of Biological Chemistry, 257: 14767-14772

Tharaud, C., Ribet, A.-M., Costes, C., Gaillardin, C. (1992)

Secretion of human blood coagulation factor XIIIa by the yeast *Yarrowia lipolytica*
Gene, 121: 111-119

Tokunaga, F., Yamada, M., Miyata, T., Ding, Y.-L., Hiranga-Kawabata, M., Muta, T., Iwanaga, S., (1993)

Limulus Hemocyte Transglutaminase: Its purification and characterization, and identification of the intracellular substrates
The Journal of Biological Chemistry , 268: 252-261

Tokunaga, F, Muta, T., Iwanaga, S., Ichinose, A., Davie, E., W., Kuma, K.-I., Miyata, T.,(1993)

Limulus Hemocyte Transglutaminase: cDNA cloning amino acid sequence and tissue localisation
The Journal of Biological Chemistry , 268: 262-268

Webb, G., C., Coggan, M., Ichinose, A., Board, P., G., (1989)

Localisation of human coagulation factor XIIIb subunit gene (F13B) to chromosome bands 1q31-32.1 and restriction fragment polymorphism of the locus.
Human Genetics, 81: 157-160

**Weraarchakul-Boonmark, N., Jeong, J.-M., Murthy, S., N., P., Engel, J., D., Lorand, L.,
(1992)**

Cloning and expression of chicken erythrocyte transglutaminase

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 89: 9804-9808

Wu, L.C.-C., Fisher, P.A., Broach, J.R., (1987)

A yeast plasmid partitioning protein is a karyoskeletal component

Journal of Biological Chemistry 262(2): 883-891

Yee, V., C., Pedersen, L., C., Le Trong, I., Bishop, P., D., Stenkamp, R., E., Teller, D., C., (1994)

Three-dimensional structure of a transglutaminase: Human blood coagulation factor XIII

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 91: 7296-7300

7. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Lingelbach und Herrn Prof. Müller für die Durchsicht der Arbeit, sowie bei Herrn Prof. Sedlaczek, der es ermöglicht hat, daß ich bei den Behringwerken meine Arbeit anfertigen konnte.

Besonders danke ich Herrn Dr. Zettlmeißl für die interessante Themenstellung und seine ständige Gesprächsbereitschaft für Sachfragen sowie für die sensible Betreuung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Grundmann, Dr. Opper und Dr. Hock und ihren Mitarbeitern möchte ich mich für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden bedanken und bei Herrn Dr. Grote und seinem Labor für die Fermentation sowie bei dem Labor Biel für die Hilfe bei der IEF, Labor Dr. Schüler für die Hilfe bei der nativ Elektrophorese und bei Labor Dr. Zilg für die HPLC- Analytik.

Die Zeit, in der ich meine Promotion bei den Behringwerken anfertigen durfte, ist mir sehr positiv im Gedächtnis, und es ist kaum möglich, mich bei wirklich allen zu bedanken, die mir geholfen haben, da sonst diese Danksagung ihren Rahmen sprengen würde. Das gute Betriebsklima und das offene Miteinander von Mitarbeitern und Vorgesetzten haben mich sehr beeindruckt. Eines der wichtigsten Dinge, die ich hier gelernt habe, ist die Freude an der Laborarbeit, maßgeblich angesteckt haben mich damit-noch vor dem Beginn meiner Promotion- Herr Dr. Seemann und seine Mitarbeiter.

Vergessen möchte ich auch nicht, mich für das Verständnis für die relativ lange Bearbeitungszeit der Schlußfassung meiner Dissertation zu bedanken, die als Folge meiner Schwangerschaft und der Erziehung meiner Tochter entstanden ist.

Lebenslauf

| | |
|-------------------------------|---|
| 19. 10. 1963 | geboren in Sulingen |
| 1970-1983 | Schulbesuch in Oldenburg |
| 10. 05. 1983 | Abitur |
| SS 1984 | Immatrikulation an der Universität Oldenburg |
| 13. 02. 1986 | Vordiplom an der Universität Oldenburg |
| WS 1986/87 | Wechsel an die Universität Marburg |
| 21. 11. 1989 | Diplom an der Universität Marburg |
| 01. 12. 1989- 31. 05. 1990 | wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg |
| 13. 07. 1990 | Heirat mit Andreas Wilke |
| 01. 11. 1990- 30. 06. 1991 | Praktikum bei den Behringwerken in Marburg |
| ab 01. 07. 1991 | Promotion bei den Behringwerken in Marburg |
| 02. 02. 1994 | Geburt der Tochter Eva-Maria |

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation „cDNA Isolation, Sequenzierung, Expression und Proteincharakterisierung des Faktor XIII der Ratte“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.